

Université de Montréal

**Étude de propriétés physico-chimiques des membranes  
lipidiques chargées d'acide palmitique/stérol et de  
stéarylamine/cholestérol**

par  
Aysha Ased

Département de chimie  
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Avril, 2016

© Aysha Ased, 2016

## Résumé

Les stérosomes, des vésicules artificielles composées d'amphiphiles monoalkylés et d'un grand pourcentage de stérols, sont prometteurs dans plusieurs domaines comme les industries pharmaceutiques et alimentaires. Il existe des stérosomes chargés négativement, positivement et neutres. Dans ce mémoire, nous avons approfondi nos connaissances sur les propriétés physico-chimiques des stérosomes chargés : acide palmitique (PA)/stérol et stéarylamine (SA)/cholestérol (Chol).

Premièrement, afin de mesurer la diffusion latérale de PA dans les membranes PA/stérol (30/70 mol/mol) par RMN à gradients pulsés, nous avons tenté de former des bicouches liquide-ordonnées (lo) orientées magnétiquement avec ce mélange. En s'inspirant de l'idée que l'ajout de 1,2-dihexanoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DHPC), un lipide à courtes chaînes, dans le système 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DMPC) mène à la formation de bicouches orientées, nous avons étudié la formulation PA-d<sub>31</sub>/acide hexanoïque (HA)/Chol avec une proportion molaire de 25/18/57 à plusieurs températures; aucune formation de bicouches orientées n'a été observée. Ce résultat pourrait être expliqué par la solubilisation partielle de HA en milieu aqueux. Alors, une quantité insuffisante serait insérée dans la bicouche pour induire son orientation. La formulation PA-d<sub>31</sub>/DHPC/Chol n'a pas conduit, elle non plus, à des bicouches orientées magnétiquement à des températures et concentrations lipidiques variées. En étudiant le mélange DMPC/DHPC/Chol (67/17/14), nous avons remarqué que la présence de Chol inhibait l'orientation magnétique des bicouches. Tandis que le mélange DMPC/DHPC/stigmastérol (SS) avec les proportions molaires 67/19/14 et 72/21/7 conduisait à des bicouches orientées avec leur normale (**n**) perpendiculaire au champ magnétique à 40 °C et 50 °C. Ces résultats suggèrent que le mélange PA/SS avec une proportion de lipide à courtes chaînes, HA et DHPC, pourrait mener à des bicouches orientées magnétiquement. Le mélange PA/Chol avec un lipide à courtes chaînes pourrait aussi être étudié en présence des lanthanides.

Deuxièmement, nous avons examiné la possibilité de moduler la libération de matériel encapsulé dans des liposomes essentiellement composés de PA et d'un stérol. Il est connu que le mélange PA/Chol (30/70) à pH  $\geq 7,5$  forme des liposomes très peu perméables. Il est avantageux de pouvoir moduler la perméabilité pour avoir un contrôle sur le temps de libération de leur

contenu, qui est un paramètre de grande importance pour les formulations liposomales de médicaments. D'abord, il a été montré que l'acide oléique (OA)/Chol (30/70) est capable de former des vésicules, ce qui n'avait jamais été prouvé auparavant. Par contre, les bicouches OA/Chol (30/70) ne sont pas plus perméables que les bicouches PA/Chol (30/70). L'ajout de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (POPC) dans le mélange PA/Chol n'augmente pas plus la perméabilité. En effet, les cinétiques de relargage de calcéine des vésicules PA/POPC/Chol (15/27.5/57.5), POPC/Chol (40/60) et POPC étaient très semblables à celle de PA/Chol (30/70). Il a été remarqué que les études littéraires se contredisent à propos de la perméabilité à la calcéine des bicouches de phosphatidylcholine (PC). L'explication de ces divergences est inconnue pour le moment. En remplaçant la moitié de la proportion molaire de Chol par le cholate de sodium (SC) dans le mélange PA/Chol (30/70), la membrane n'était pas plus apte à libérer son contenu. Il se pourrait que le SC se retrouvant dans la bicouche n'induit pas une diminution d'empilement. Il est aussi possible que le SC ne s'insère pas dans la membrane à cause de son hydrophilie considérable et il pourrait alors former seul des micelles. En remplaçant complètement le Chol par le sulfate de cholestérol (SChol), un stérol chargé négativement, et en préparant les vésicules à un bas pH, la formulation PA/SChol (30/70) mène à une très grande perméabilité à pH 7.5; le relargage est provoqué par un saut de pH. Nos travaux suggèrent qu'il serait possible de moduler la perméabilité des liposomes en les préparant avec le mélange PA/SChol/Chol en variant les proportions entre 30/63/7 à 30/70/0. Le diagramme pH-composition du mélange PA/SChol/Chol indique que ces proportions conduisent, à pH 7.4, à la coexistence de phases solide et liquide en différentes proportions, ce qui pourrait moduler la perméabilité membranaire.

Troisièmement, les résultats de perméabilité obtenus avec la calcéine et les difficultés survenues lors de l'extrusion des vésicules encapsulant cette sonde nous ont amené à nous demander si la calcéine interagit avec les bicouches chargées. L'impact de certains anions, dont la calcéine, a été examiné sur les bicouches chargées positivement SA/Chol (50/50). La calorimétrie différentielle à balayage (DSC, de l'anglais *differential scanning calorimetry*), indique qu'il n'y a aucune transition entre 25 et 90 °C pour les liposomes SA/Chol (50/50) à pH = 7.4. L'ajout de NaCl (375 mM) n'a pas mené à la formation d'agrégats et aucune transition n'a été observée sur le thermogramme. La formation d'agrégats macroscopiques instantanément après l'ajout des sels Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (125 mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (125 mM) et calcéine (3 mM) a été observée.

Une transition a été observée sur les thermogrammes en présence de ces sels. Les agrégats observés pourraient être associés à la transition de phase. L'effet des anions sur la température et l'enthalpie de transition suivent le même ordre que la série d'Hofmeister :  $SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > Cl^-$  (*pas de pic*). La calcéine avait l'impact le plus prononcé sur l'agrégation; ceci illustre que la calcéine n'est pas une sonde fluorescente inerte avec le mélange SA/Chol. Elle pourrait être un chaotrope volumineux. De plus, les interactions SA-calcéine plus fortes, menant à l'agrégation des vésicules, que les interactions PC-calcéine pourraient s'expliquer par le fait que la SA est chargée positivement.

**Mots-clés** : Perméabilité, bicouches orientées magnétiquement, acide palmitique, acide oléique, cholestérol, calcéine, stéarylamine, série d'Hofmeister

## Abstract

Sterosomes are artificial vesicles that are composed of monoalkylated amphiphiles and a large percentage of sterols. They are promising in areas such as pharmaceutical and food industries. Sterosomes can be found in anionic, cationic and neutral form. The work of this master's thesis focuses on gaining additional knowledge on the physicochemical properties of charged sterosomes such as palmitic acid (PA)/sterol and stearylamine (SA)/cholesterol (Chol).

Our first aim was to find an approach to form liquid-ordered (lo) bilayers that can orient in a magnetic field with the PA/sterol (30/70 mol/mol) mixture. This will allow us to study the lateral diffusion of PA. It has been demonstrated that mixing 1,2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC), a short chain lipid, with 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) results in bilayers that orient with their normal ( $\mathbf{n}$ ) perpendicular to the magnetic field. Therefore, PA-d<sub>31</sub>/hexanoic acid (HA)/Chol (25/18/57) mixture was studied at different temperatures; however, results showed no bilayer orientation. It was suggested that this could be due to the partial solubility of HA in aqueous phase. Consequently, an insufficient quantity of HA was available to induce bilayer orientation. Furthermore, PA-d<sub>31</sub>/DHPC/Chol mixture was studied at different temperatures and lipid concentrations, which also led to no bilayer orientation. While studying DMPC/DHPC/Chol (67/17/14) formulation, it was understood that Chol inhibits bilayer orientation. On the other hand, two different molar proportions of DMPC/DHPC/stigmasterol (SS) (67/19/14 and 72/21/7) led to bilayers that orient with their  $\mathbf{n}$  perpendicular to the magnetic field at 40 °C et 50 °C. These results suggest that by adding a short chain lipid such as HA and DHPC to PA/SS mixture could lead to oriented bilayers. Another interesting track would be to work with PA/short chain lipid/Chol mixture in the presence of lanthanides.

Our second aim was to find different formulations of vesicles, containing at least PA and a sterol, with distinctive permeability. It has already been established that PA/Chol (30/70) bilayers are in lo phase as long as PA is deprotonated ( $\text{pH} \geq 7,5$ ) and have a very limited permeability. The ability to modulate permeability would allow control over the release time of an encapsulated product, which is an important parameter in the development of novel liposomal drug delivery systems. It was proven that oleic acid (OA)/Chol (30/70) mixture is able to form

bilayers, which has not been shown previously. However, OA/Chol (30/70) bilayers were not much more permeable than PA/Chol (30/70) bilayers. Adding 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) in PA/Chol system did not lead to higher permeability either. Results of calcein release kinetics from PA/POPC/Chol (15/27.5/57.5), POPC/Chol (40/60) and POPC vesicles were not very different from the one found for PA/Chol (30/70) vesicles. It was noted that contradictory results were found in the literature regarding calcein permeability from phosphatidylcholine (PC) membranes. For the moment, explanations related to these divergences have yet to be given. Furthermore, no increase in membrane permeability was found after substituting half of the molar proportion of Chol by sodium cholate (SC) in PA/Chol (30/70) mixture. One suggestion would be that SC insertion in the bilayer does not induce a reduction in the packing of lipids. Another suggestion would be that SC does not insert in PA/Chol bilayers due to its considerable hydrophilic character and forms micelles on its own. Highly permeable membrane was found when Chol was completely replaced by cholesterol sulfate (SChol), a negatively charged sterol, and vesicle preparation was done at low pH. The pH-triggered release method was used. Our work suggests that by varying the molar proportion of PA/SChol/Chol mixture between 30/63/7 and 30/70/0, it would be possible to obtain different vesicle formulations with distinctive permeability. In between these molar proportions, the pH-composition diagram of PA/SChol/Chol shows the coexistence of solid and lo phases in different proportions at pH 7.4, which could modulate the permeability.

Some ambiguous calcein release results and struggles arising from the extrusion of calcein-encapsulated liposomes led us to wonder if this dye interacts with charged bilayers. The impact of some anions, including calcein, was examined on SA/Chol (50/50) charged bilayers. Thermodynamic studies were done by differential scanning calorimetry (DSC). SA/Chol (50/50) mixture showed no transition between 25 and 90 °C at pH 7.4. In the presence of NaCl (375 mM), there was no indication of aggregation or the appearance of a transition on the thermogram. Macroscopic aggregates were instantly observed after addition Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (125 mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (125 mM) and calcein (3 mM). Furthermore, a phase transition was also noticed on the thermograms in the presence of these salts. It is suggested that the appearance of the transition can be associated with the formation of aggregates. The effect of anions on the transition temperature and enthalpy follows the Hofmeister series:  $SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > Cl^-$  (no peak). Calcein had the highest impact on the formation of aggregates. This indicates that calcein is not a good candidate

to be used as a fluorescent dye with SA/Chol mixture. It was suggested that calcein could be a large chaotrope anion. In contrast to PC-calcein interactions, SA-calcein interactions led to the aggregation of vesicles probably due to stronger interactions in the presence of positively charged SA.

**Keywords:** Permeability, bilayers oriented under magnetic field, palmitic acid, oleic acid, cholesterol, stearylamine, calcein, Hofmeister series

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>xi</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Liste des abréviations et symboles</b> .....	<b>xv</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xxi</b>
<b>Chapitre 1</b>	
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. : Nanovecteurs</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. : Liposomes</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3. : Stérosomes</b> .....	<b>2</b>
<b>1.4. : Les amphiphiles</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5. : Phase lamellaire lo</b> .....	<b>7</b>
1.5.1. : Effet des stérols.....	7
1.5.2. : Interactions électrostatiques .....	9
1.5.3. : Morphologie moléculaire.....	10
<b>1.6 : RMN de solide du <sup>2</sup>H et du <sup>31</sup>P</b> .....	<b>11</b>
1.6.1. : RMN de solide du <sup>2</sup> H .....	13
1.6.2. : RMN de solide du <sup>31</sup> P .....	18
<b>1.7. : Contenu du mémoire</b> .....	<b>21</b>
1.7.1. : Formation de bicouches lo orientées magnétiquement composées de PA et d'un stérol (Chapitre 3) .....	21
1.7.2. : Contrôle de la perméabilité de vésicules composées de PA et de stérol (Chapitre 4) .....	21
1.7.3. : Effet des anions, dont la calcéine, sur des bicouches lo chargées positivement composées de SA et Chol (Chapitre 5).....	22



## Chapitre 2

<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 : Matériels .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 : Préparation des vésicules multilamellaires .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 : Mesures de spectroscopie RMN .....</b>	<b>24</b>
2.3.1 : Préparation de l'échantillon .....	24
2.3.2 : Expérience en RMN du <sup>2</sup> H .....	24
2.3.3 : Expérience en RMN du <sup>31</sup> P .....	24
<b>2.4 : Mesures de perméabilité.....</b>	<b>25</b>
2.4.1 : Préparation de l'échantillon .....	25
2.4.2 : Expérience de fluorescence .....	26
<b>2.5 : Mesures de calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....</b>	<b>28</b>
<b>2.6 : Mesures de la diffusion dynamique de la lumière (DLS).....</b>	<b>28</b>

## Chapitre 3

<b>Formation de bicouches lo orientées magnétiquement composées d'acide palmitique et d'un stérol .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 : Introduction.....</b>	<b>29</b>
3.1.1 : Les approches .....	31
<b>3.2 : Résultats et discussion.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 : Conclusion .....</b>	<b>39</b>

## Chapitre 4

<b>Contrôle de la perméabilité de vésicules composées d'acide palmitique et de stérol .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 : Introduction.....</b>	<b>41</b>
4.1.1 : Les approches .....	43
<b>4.2 : Résultats et discussion.....</b>	<b>45</b>
4.2.1 : Relargage passif.....	45
4.2.2 : Relargage induit par le pH.....	49
<b>4.3 : Conclusion .....</b>	<b>53</b>

## **Chapitre 5**

### **Effet des anions, dont la calcéine, sur des bicouches chargées positivement composées de stéarylamine et cholestérol..... 54**

#### **5.1 : Introduction..... 54**

##### 5.1.1 : Évolution de la théorie.....55

##### 5.1.2 : Agrégation des vésicules.....56

##### 5.1.3 : Effet de sels sur l'agrégation .....57

##### 5.1.4 : Effet des anions chaotropes volumineux.....58

#### **5.2 : Résultats et discussion..... 60**

#### **5.3 : Conclusion ..... 64**

## **Chapitre 6**

### **Conclusion générale ..... 65**

### **Références.....xxiii**

## Liste des figures

<b>Figure 1.1.</b> : La coupe transversale d'un liposome.....	1
<b>Figure 1.2.</b> : Structures des phospholipides, des stérols, des acides gras étudiés dans le mémoire.....	6
<b>Figure 1.3.</b> : Représentation schématique de différentes phases des membranes de phospholipides : <b>(a)</b> phase solide et gel, <b>(b)</b> phase lo et <b>(c)</b> phase liquide-désordonnée. ....	8
<b>Figure 1.4.</b> : Représentation schématique de la morphologie de PA déprotoné et de Chol. ....	11
<b>Figure 1.5.</b> : Différents niveaux d'énergie et les raies du spectre RMN du $^2\text{H}$ à l'état solide résultant de la contribution d'interactions quadripolaires où $\nu_0$ est la fréquence de Larmor. ....	13
<b>Figure 1.6.</b> : Influence de l'orientation de la liaison C-D par rapport au champ magnétique sur les interactions quadripolaires et le spectre de poudre résultant de la superposition de différents doublets associés à différentes orientations. ....	15
<b>Figure 1.7.</b> : Spectre RMN du $^2\text{H}$ d'amphiphiles deutérés en phase solide <b>(a)</b> , en phase lamellaire gel <b>(b)</b> , en phase lamellaire fluide <b>(c)</b> et en phase isotrope (solution, micelles, phases cubiques) <b>(d)</b> . ....	15
<b>Figure 1.8.</b> : Définition des angles $\theta$ , $\gamma$ et $\alpha$ . L'axe n est la normale de la bicouche. Le a est le plus long axe de la molécule. ....	16
<b>Figure 1.9.</b> : Spectre RMN du $^2\text{H}$ d'une suspension multilamellaire de DMPC- $\text{d}_{54}$ à 40 °C <b>(a)</b> . Spectre RMN du $^2\text{H}$ de bicouches DMPC- $\text{d}_{54}$ orientées magnétiquement avec leur axe n à 90° par rapport au champ magnétique à 40 °C <b>(b)</b> . ....	18

<b>Figure 1.10.</b> : Spectre RMN du $^{31}\text{P}$ d'une suspension multilamellaire de DMPC- $\text{d}_{54}$ à 40 °C <b>(a)</b> . Spectre RMN du $^{31}\text{P}$ de bicouches DMPC- $\text{d}_{54}$ orientées magnétiquement avec leur axe n à 90° par rapport au champ magnétique à 40 °C <b>(b)</b> . .....	20
<b>Figure 3.1.</b> : Une bicelle <b>(a)</b> et des lamelles poreuses <b>(b)</b> . .....	29
<b>Figure 3.2.</b> : Spectre RMN du $^2\text{H}$ de DMPC- $\text{d}_{27}$ /DHPC (ratio = 3.55), avec une concentration lipidique de 0.2 g/mL à 37 °C <b>(a)</b> . Spectre RMN du $^{31}\text{P}$ de DMPC/DHPC (ratio 2.70), avec une concentration lipidique de 0.2 g/mL à 37 °C <b>(b)</b> . .....	31
<b>Figure 3.3.</b> : Spectres de RMN du $^2\text{H}$ à 25 °C à pH ~ 8.4, du mélange PA- $\text{d}_{31}$ /Chol (30/70) à une concentration lipidique de 0.03 g/mL <b>(a)</b> , PA- $\text{d}_{31}$ /HA/Chol (25/18/57) à 0.03 g/mL <b>(b)</b> et PA- $\text{d}_{31}$ /DHPC/Chol (26/14/60) à 0.1 g/mL <b>(c)</b> . .....	35
<b>Figure 3.4.</b> : Spectres de RMN du $^{31}\text{P}$ à 25 °C de DMPC/DHPC (78/22) à 0.25 g/mL <b>(a)</b> , à 25 °C de DMPC/DHPC/Chol (67/19/14) à 0.25 g/mL <b>(b)</b> , à 25 °C de DMPC/DHPC/SS (72/21/7) à 0.25 g/mL <b>(c)</b> , à 40 °C de DMPC/DHPC (78/22) à 0.25 g/mL <b>(d)</b> , à 40 °C de DMPC/DHPC/Chol (67/19/14) à 0.25 g/mL <b>(e)</b> et à 40 °C de DMPC/DHPC/SS (72/21/7) à 0.25 g/mL <b>(f)</b> . .....	37
<b>Figure 4.1.</b> : Cinétique de relargage passif de Dox des vésicules unilamellaires de EPC/Chol (55/45) et de DSPC/Chol (55/45) à 25 °C. ....	42
<b>Figure 4.2.</b> : Libération de calcéine des vésicules unilamellaires de POPC (■), de POPC/Chol (40/60) (●) et OA/Chol (30/70) (▲) à pH 8.4 pour 25, 37 et 50 °C après une semaine. ....	48
<b>Figure 4.3.</b> : Cinétique de relargage passif (pH = 5.5) (■) et de relargage induit par le saut de pH de 5.5 à 7.4 (●) de Sulf B des vésicules unilamellaires de PA/Schol (30/70) (n = 3) à 25 °C. ....	50
<b>Figure 4.4.</b> : Cinétique de relargage induit par le saut de pH de 5.5 à 7.4 de calcéine des vésicules PA/Schol (30/70) (n = 3, sauf pour 48 h où n = 1), à 25 (■) et 37 °C (●) et PA/Schol/Chol (30/35/35) (n= 1) à 25 °C (▲). .....	51

**Figure 5.1.** : Deux séries d’Hofmeister représentant l’ordre des ions en terme de leur habileté à affecter la solubilité des protéines d’œuf de poule.....54

**Figure 5.2.** : Effet de kosmotropes et chaotropes sur certaines propriétés. ....56

**Figure 5.3.** : Structure de calcéine.....59

**Figure 5.4.** : Schéma de la monocouche perturbée en présence des anions chaotropes et en présence des anions chaotropes volumineux.....59

**Figure 5.5.** : Thermogrammes du mélange SA/Chol (50/50) hydraté dans le tampon TRIS (5 mM) en présence de différents ions.....61

**Figure 5.6.** : Les mélanges SA/Chol (50/50) hydratés dans le tampon TRIS (5 mM) : en absence d'autre sel **(a)**, en présence de  $\text{HPO}_4^{2-}$  (125 mM) **(b)**, de  $\text{SO}_4^{2-}$  (125 mM) **(c)** et de calcéine (3 mM) **(d)**.....62

## Liste des tableaux

<b>Tableau 3.1.</b> : Position des bandes des spectres RMN du $^{31}\text{P}$ de différents mélanges lipidiques .....	38
<b>Tableau 5.1.</b> : Enthalpie de transition associée au pic principal des thermogrammes du mélange SA/Chol (50/50) hydraté dans le tampon TRIS (5 mM) en présence de différents ions .....	62

## Liste des abréviations et symboles

$a$	Axe le long de la chaîne alkyle du lipide
$a_0$	Aire de la tête hydrophile d'un amphiphile
$A_{CC}$	Aire totale occupée par l'amphiphile à courtes chaînes dans les bicouches orientées magnétiquement
$A_{LC}$	Aire totale occupée par l'amphiphile à longues chaînes dans les bicouches orientées magnétiquement
$A_Q$	Constante quadripolaire statique
$B$	Champ magnétique externe
$B_{Local}$	Champ magnétique local
CCA	Concentration critique d'agrégation
Chol	Cholestérol
$d$	Épaisseur hydrophobique de la bicouche
DHPC	1,2-dihexanoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
DLS	Diffusion dynamique de la lumière ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
DMPC-d <sub>54</sub>	1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine perdeutérée
DOPC	1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphatidyléthanolamine
Dox	Doxorubicine
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycérol-3-phosphocholine

DSC	Calorimétrie différentielle à balayage ( <i>differential scanning calorimetry</i> )
DSPC	1,2-distéaroyl-sn-glycérol-3-phosphocholine
$e$	Charge élémentaire
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EPC	Phosphatidylcholine d'oeuf
$E_Z$	Effet de Zeeman
$FF$	Facteur de forme
FRAP	Redistribution de fluorescence après photoblanchiment ( <i>Fluorescence recovery after photobleaching</i> )
HA	Acide hexanoïque
Hepes	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
$H_{\parallel}$	Phase hexagonale inversée
$I$	Spin d'un noyau
$I_c$	Longueur critique de la chaîne hydrophobe
$I_i$	Intensité initiale lorsque toute la sonde est encapsulée dans les liposomes
$I_{i+T}$	Intensité initiale quand toute la sonde des liposomes est relarguée en ajoutant du Triton X-100
$I_f$	Intensité après un temps donné d'incubation
$I_{f+T}$	Intensité après un temps donné d'incubation quand toute la sonde des liposomes est relarguée en ajoutant du Triton X-100
$L_{\alpha}$	Phase lamellaire liquide-désordonnée



Gel	Phase lamellaire solide-ordonnée
lo	Phase lamellaire liquide-ordonnée
Mes	Acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique
$m_l$	Nombre quantique magnétique d'un spin $I$ non nul
$n$	Normale de la bicouche
OA	Acide oléique
PA	Acide palmitique
PA-d <sub>31</sub>	Acide palmitique perdeutééré
PC	Phosphatidylcholine
POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine
POPE	1-palmitoyl-2-oléoyl-phosphatidyléthanolamine
RMN	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
SA	Stéarylamine
SC	Cholate de sodium
SChol	Sulfate de cholestérol
$S_{C-D}$	Paramètre d'ordre orientationnel
$\langle S_{CD} \rangle$	Moyenne du paramètre d'ordre orientationnel le long de la chaîne alkyle lipidique
$S_{mol}$	Paramètre d'ordre moléculaire
SS	Stigmastérol
Sulf B	Sulforhodamine B
$Q$	Quadripôle

$T$	Température
$t$	Temps donné d'incubation
$t_0$	Temps initial
$T_h$	Température de transition de phase lamellaire liquide-désordonnée à phase hexagonale inversée
$T_m$	Température de transition de phase lamellaire gel à liquide-désordonnée
TPB <sup>-</sup>	Tétraphénylborate
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
$v$	Volume de la chaîne alkyle
$X_L$	Fraction molaire du composé L
$\Delta E_{CSA}$	Énergie correspondant à l'anisotropie du déplacement chimique.
$\Delta E_D$	Interaction dipolaire
$\Delta E_Q$	Interaction quadripolaire
$\Delta E_{SC}$	Couplage spin-spin
$\Delta \nu_Q$	Éclatement quadripolaire
$\Delta \sigma$	Anisotropie du déplacement chimique
$\Delta \chi$	Anisotropie de la susceptibilité magnétique
$\nu_0$	Fréquence de Larmor
$\sigma$	Tenseur statique
$\sigma'$	Tenseur de symétrie axiale

$\sigma_{av}$	Déplacement chimique moyenné en RMN de $^{31}\text{P}$ (isotrope)
$\sigma_{\parallel}$	Composante du tenseur de symétrie axiale parallèle à la normale de la bicouche
$\sigma_{\perp}$	Composante du tenseur de symétrie axiale perpendiculaire à la normale de la bicouche
$\omega$	Fréquence de résonance en RMN de $^{31}\text{P}$

*À mon être, à ma mère, à mes frères et  
surtout à cet univers à qui j'appartiens*

## Remerciements

*I would like to thank my mother for the countless time that she devoted to me. Her inner beauty cannot be overshadowed; it even shines to strangers. She taught me a lot but most importantly she taught me to love. Her behavior with her children and her grandchildren is a pure example of unconditional love in practice. Hopefully, I will be able to pass this gift in heritage to the next generation. Mom, you are my driving force. You dreamed and wished the best for me. You also expected the best from me, which gave me the strength and drive to do something commendable with my life. I come to understand with age that my heartbeat sings the same rhythm as yours but just at a different tempo.*

*I would like to take this opportunity to thank Hossam. The man lives for his family. His kind, helpful, generous and joyful nature makes you want to be like him. When you think of him what comes to mind is an extremely caring and hardworking teddy bear. How can I not mention his talent for cooking? A horrible day will end on a nice note if you eat a meal he made. Your presence in my life constantly reminds me of the importance of family. Mostly, I thank you and Faiza for giving me two cute and very smart bunnies, Ayan and Salman, to play with. They keep my inner child alive.*

*I would like to acknowledge the presence of Hosham in my life. I admire and respect him, like no one else, for his intelligence, his ambitions and his numerous polyvalent talents. His advice on a professional level always helped me grow. He always pushed me to be ambitious and to think big for myself... But, I would especially like to thank him for being my friend. You are the first friend I ever made. You have been there for me like a guardian since birth. You let me make my choices and live my experiences in life... But you are always there, silently protecting me from a distance.*

*I would like to thank my family in London for having me in their home while I was writing. My aunt is just a bundle of joy who constantly keeps you entertained. On a bad day or a good day, she will always have a beautiful smile regardless. My uncle is a treasure of wisdom who is always there to guide you in the right direction when you are troubled by a thought. Their kindness, hospitality and love made me feel at home away from home. Thank you!*

*I am going to take this moment to thank my best friends Rose, Anoulack Khemmanivong and Laura Ly. You guys are family to me. Your help, moral support, and time are extremely precious to me. Years dedicated to my education would have not been as much fun without having you guys around. I would also like to thank my friends Frédéric D'Anjou, Nadia Camara Agnant, and Mathieu Blain who helped me in different ways for this master's thesis.*

Puis, j'aimerais remercier plusieurs de mes professeurs, côtoyés durant mes études du primaire jusqu'à l'université. Vous avez partagé vos connaissances avec moi. Vous avez joué un grand rôle dans mon amour pour la science. J'ai un extrême respect et beaucoup d'admiration pour vous tous.

De surcroît, j'aimerais aussi remercier Prof. André Beauchamp, Prof. Christian Reber, Mme Céline Millette, Mme Line Raymond et Cédric Malveau. Et puis, j'aimerais remercier les membres du Groupe Lafleur, surtout Adrian Paz Ramos, Robert Poulin, Benjamin Busseniers et Maxime Demazeau, pour leur aide dans mon projet de recherche.

Finalement, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Prof. Michel Lafleur, pour le temps qu'il a investi dans mon projet. Malgré les nombreuses tâches dont il est chargé en tant que professeur à l'université, il est toujours disponible pour discuter de la chimie avec ses étudiants. Ses divers conseils ont été très utiles pour mon projet de recherche.

# Chapitre 1

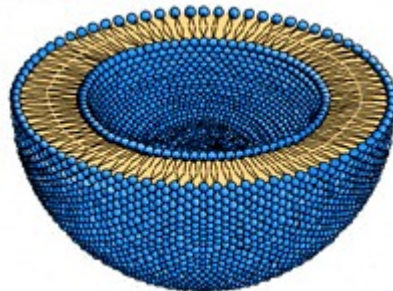
## Introduction

### 1.1. : Nanovecteurs

Les nanovecteurs sont des véhicules qui ont pour but de transporter et/ou protéger des ingrédients actifs jusqu'au site destiné. Ils ont une taille de l'ordre de 100 nm. Les ingrédients actifs sont encapsulés, attachés ou incorporés dans la bicouche. Il existe une variété de nanovecteurs qui peuvent être composés de matériaux organiques et/ou inorganiques. Les nanovecteurs les plus courants sont des nanoparticules, des micelles polymériques, des dendrimères, des polymère-drogues conjugués et des liposomes. L'intérêt de ce mémoire est les liposomes.

### 1.2. : Liposomes

Un liposome est une vésicule artificielle formée d'une bicouche (phase lamellaire). L'auto-assemblage des molécules amphiphiles dans un milieu aqueux peut mener à la formation de liposomes (**Figure 1.1**) capables d'encapsuler une grande variété de molécules. Beaucoup d'études ont été menées pour comprendre leurs propriétés dans le but de les utiliser comme des transporteurs de médicaments, d'agents de conservation, de pigments, etc<sup>1</sup>. Les liposomes conventionnels sont obtenus à partir de phospholipides. Cependant, leur réactivité en milieu biologique et leur coût élevé limitent leur utilisation, ce qui explique l'intérêt d'étudier les stérosomes.



**Figure 1.1.** : La coupe transversale d'un liposome

### 1.3. : Stérosomes

Les liposomes composés d'amphiphiles monoalkylés et de stérols ont été nommés stérosomes parce qu'ils sont très riches en stérol. Il existe différents types de stérosomes : ils peuvent être composés des espèces ioniques, zwitterioniques ou neutres. En général, au moins une des composantes des stérosomes doit être chargée pour obtenir des bicouches liquide-ordonnées (lo) stables pour des raisons qui vont être détaillées dans la **section 1.5.2**.

Les mélanges composés de cholestérol (Chol), un stérol neutre, et d'acides gras linéaires saturés déprotonés forment des stérosomes chargés négativement<sup>2</sup>. L'acide palmitique (PA) et le Chol sont incapables de former individuellement des bicouches lo en milieu aqueux. Les travaux précédents montrent que le mélange PA/Chol avec une proportion molaire de 30/70 est en phase lamellaire lo stable lorsque le PA est déprotoné ( $\text{pH} \geq 7,5$ )<sup>3</sup>. La perméabilité des liposomes PA/Chol (30/70 mol/mol) est très limitée dans ces conditions<sup>1</sup>. La stabilité de ces liposomes est aussi sensible au pH<sup>1</sup>, une propriété exploitée pour moduler le taux de libération du matériel encapsulé comme illustré au **chapitre 4**. Ce comportement semble être général car il a été montré que le PA fait aussi des bicouches lo avec les stérols neutres suivants : le dihydrocholestérol, le 7-déhydrocholestérol, le stigmastanol, l'ergostérol et le stigmastérol (SS). En présence de ces stérols, le mélange PA/stérol (30/70) a toujours la possibilité d'être en phase lamellaire lo<sup>4</sup>. Les résultats montrent aussi que les acides gras avec les chaînes alkyles saturées et linéaires de 14-18 carbones sont capables de former des bicouches lo en présence de Chol<sup>2</sup>.

La littérature montre la possibilité de former des stérosomes chargés positivement. Le mélange équimolaire stéarylamine (SA)/Chol (50/50) est capable de former des bicouches lo, entre 25 et 80 °C, tant que le pH du milieu est inférieur au  $\text{pK}_a$  de la SA, soit  $\text{pH} < 9,5$ <sup>5</sup>. De plus, les deux détergents cationiques, chlorure de cétypyridinium et bromure de cétyltriméthylammonium, formant des micelles lorsqu'ils sont seuls en milieu aqueux, sont en phase lamellaire lo en présence de cholestérol<sup>6-8</sup>.



Un mélange amphiphile monoalkylé/stérol où les deux espèces ont des charges opposées est aussi capable de s'auto-assembler pour former des bicouches lo stables. Le mélange chlorure de cétylpyridinium/SChol (30/70) forme une phase lamellaire lo stable entre 10 et 70 °C ( $5 < \text{pH} < 9$ )<sup>6</sup>. Dans ces conditions, le sulfate de cholestérol (SChol) porte une charge négative. L'amphiphile monoalkylé zwitterionique lysophosphatidylcholine forme une phase lamellaire lo avec le Chol<sup>9</sup>.

Il existe dans la littérature quelques exemples de stérosomes composés d'espèces neutres. Ces derniers sont aussi connus sous le nom de niosomes. Les esters d'alkyles, des surfactants non ioniques, forment des bicouches lo stables en présence de Chol<sup>10</sup>. De même, le diglycéryl monolaurate et le tétraglycéryl monolaurate sont aussi des amphiphiles monoalkylés neutres qui forment des bicouches lo avec, respectivement, 10 et 30 (mol) % de Chol<sup>11</sup>. La grande taille de leur tête polaire semble permettre la formation de bicouches stables. Le mélange 1-(méthylsulfinyl)octadécane/Chol est aussi capable de former une phase lamellaire lo à la température ambiante, mais celle-ci est métastable<sup>12</sup>.

Le but de ce mémoire est d'étudier certaines propriétés physico-chimiques des stérosomes lipidiques chargés PA/stérol et SA/Chol. Le premier objectif était de former des bicouches lo orientées magnétiquement avec le mélange PA/stérol pour être capables de mesurer la diffusion latérale de PA. Le deuxième objectif était de développer différentes vésicules, principalement composées de PA et d'un stérol, avec différentes perméabilités pour avoir un contrôle sur le temps de libération de leur contenu, ce qui peut être grandement utile par exemple pour vectoriser un médicament. Le troisième objectif était d'examiner l'effet de divers anions, dont la calcéine, sur les bicouches du mélange SA/Chol (50/50) et d'étudier si l'ampleur de cet effet progresse selon la série d'Hofmeister.

## 1.4. : Les amphiphiles<sup>13-15</sup>

Les amphiphiles ont une partie apolaire hydrophobe (chaînes alkyles) et une partie polaire hydrophile (tête polaire). La **figure 1.2** montre la structure des amphiphiles, les phospholipides, les stérols et les amphiphiles monoalkylés, étudiés dans ce mémoire.

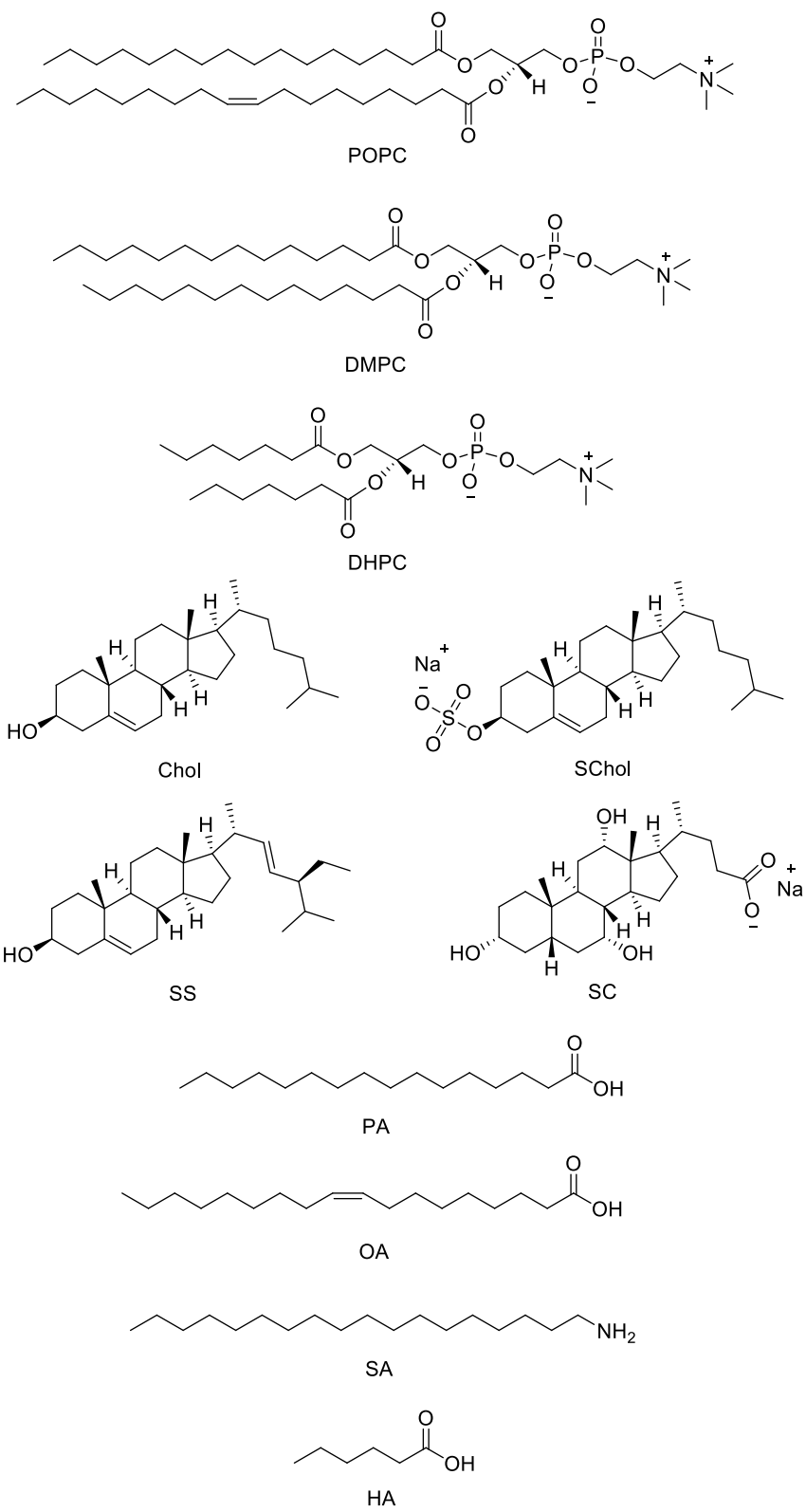
Les phospholipides sont parmi les lipides les plus abondants dans les membranes cellulaires d'eucaryotes. Ces lipides possèdent un groupement phosphate auquel est greffé un groupement fonctionnel. Parmi divers groupements fonctionnels, il y a la choline menant à la phosphatidylcholine (PC). Environ 60 (mol) % des phospholipides des membranes d'érythrocytes sont des PC<sup>16</sup>. Les phospholipides possèdent généralement deux chaînes. Certains possèdent deux chaînes saturées comme la 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DMPC) et la 1,2-dihexanoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DHPC) (**Figure 1.2**). D'autres ont une chaîne saturée et une insaturée comme la 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (POPC). La double liaison dans la chaîne insaturée a une configuration "cis". La DMPC, la DHPC et la POPC sont les trois lipides utilisés dans les travaux de ce mémoire.

Les stérols forment une autre famille importante de lipides. Le Chol est un des exemples de lipides appartenant à cette famille (**Figure 1.2**). Le Chol est un composant qui est étudié extensivement. En général, il représente un grand pourcentage des membranes eucaryotes plasmiques. Le Chol joue un rôle essentiel dans différents types de fonctions membranaires comme la formation de radeaux, l'adressage des protéines et la signalisation cellulaire<sup>17-20</sup>. Sa structure est différente des phospholipides. La tête polaire est un simple groupe hydroxyle (-OH). La partie hydrophobe est un squelette stéroïde rigide auquel est greffée une chaîne hydrocarbonée. Le squelette stéroïde est constitué de quatre anneaux (trois cycles à six carbones et un cycle à 5 carbones). Les anneaux sont reliés par la configuration trans en créant une structure plane et rigide. Cette structure est caractéristique de plusieurs analogues de Chol. Le système cyclique de Chol a une face plane sans groupement alkyl substituant et une face irrégulière avec deux groupements méthyls (C18 et C19) qui sont greffés dans une configuration cis<sup>21</sup>. Le SChol, le SS et le cholate de sodium (SC) sont trois autres stérols utilisés dans ce mémoire (**Figure 1.2**). Le SChol possède un groupe sulfate à la place d'un groupe hydroxyle. Le SS diffère de Chol au niveau de la chaîne hydrocarbonée, car celle-ci possède une liaison double

et un groupement éthyle de plus. Le SC possède un groupement carboxylate (C17) et des deux groupes hydroxyles sur le système cyclique.

Plusieurs amphiphiles monoalkylés sont des acides gras. Ils sont composés d'un groupe carboxylique et d'une chaîne alkyle saturée ou insaturée (**Figure 1.2**). Les acides gras saturés sont présents dans la couche externe de la peau (stratum corneum); ils possèdent entre 16 et 28 carbones et ceux avec 22 et 24 carbones sont les plus abondants<sup>22-23</sup>. Les acides gras étudiés dans ce mémoire sont : le PA, l'acide hexanoïque (HA) et l'acide oléique (OA). La SA est un amphiphile monoalkylé, chargé positivement avec un groupement ammonium, qui est aussi étudié.

À basse concentration dans un milieu aqueux, les amphiphiles sont solubles dans l'eau; ils restent sous la forme monomère. La concentration critique d'agrégation (CCA) est définie comme étant la concentration à laquelle l'auto-assemblage des amphiphiles apparaît. Donc, au-dessus de la CCA, différentes structures d'auto-assemblages peuvent être observées comme la phase micellaire, hexagonale inversée ( $H_{II}$ ), lamellaire<sup>24-26</sup>. La CCA des lipides diminue beaucoup avec l'augmentation de longueur de chaînes alkyles. La CCA de DHPC et de 1,2-dipalmitoyl-sn-glycérol-3-phosphocholine (DPPC) sont 1.4 mM et 0.46 mM, respectivement<sup>27</sup>; il y a formation de la phase lamellaire au-delà de cette concentration. La CCA de HA déprotoné et PA déprotoné sont 1.60 M et 3.2 mM, respectivement<sup>28-29</sup>; il y a formation de la phase micellaire au-delà de cette concentration. De plus, comme les acides gras possèdent une seule chaîne alkyle en comparaison aux phospholipides qui en possèdent généralement deux, la CCA des acides gras est nettement plus grande que celle des phospholipides pour une même longueur de chaîne alkyle.



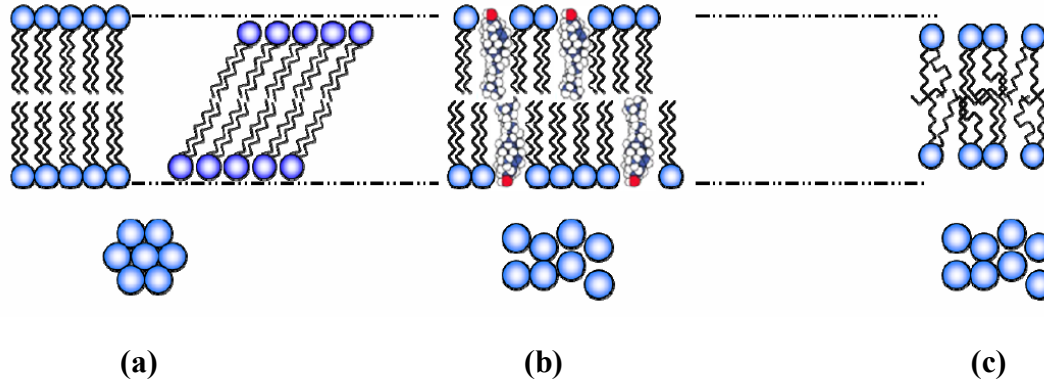
**Figure 1.2.** : Structures des phospholipides, des stérols, des acides gras étudiés dans le mémoire.

## 1.5. : Phase lamellaire $l_0$

Il existe plusieurs phases de cristal liquide avec différentes architectures. Pour ce mémoire, notre intérêt se limite à la phase lamellaire. Les facteurs qui jouent un rôle crucial dans la formation d'une phase lamellaire  $l_0$  stable sont : la nature et morphologie d'amphiphiles monoalkylés et de stérols, la compatibilité hydrophobe, les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogène.

### 1.5.1. : Effet des stérols

La bicouche de phospholipides peut exister sous diverses phases. Les plus courantes sont la phase solide-ordonnée (gel) (**Figure 1.3; a**) et la phase fluide liquide-désordonnée ( $L_\alpha$ ) (**Figure 1.3; c**). Dans la phase gel, presque toutes les chaînes sont étirées, rigides et en conformation trans. Les chaînes peuvent être parallèles ou inclinées par rapport à la normale de la bicouche ( $\mathbf{n}$ ) dépendamment de la taille de la tête polaire et des chaînes alkyles. Ces différentes structures ont une influence sur l'épaisseur de la bicouche. Les têtes polaires sont organisées avec un empilement hexagonal ou orthorhombique. Le coefficient de la diffusion latérale des phospholipides est bas et de l'ordre  $1 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ <sup>30</sup>. Donc, la bicouche en phase gel est caractérisée par des chaînes hautement ordonnées avec peu de fluidité. Dans la phase liquide-désordonnée, les chaînes sont plus désordonnées à cause de l'isomérisation trans-gauche. Les bicouches en phase liquide-désordonnée sont moins épaisses qu'en phase gel. L'empilement des têtes polaires n'a aucune symétrie. Le coefficient de diffusion latérale des phospholipides est plus grand qu'en phase gel, environ  $4 \text{ à } 12 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ <sup>30</sup>. La température de transition de la phase gel à la phase liquide-désordonnée ( $T_m$ ) est caractéristique pour chacun des lipides.



**Figure 1.3.** : Représentation schématique de différentes phases des membranes de phospholipides : **(a)** phase solide et gel, **(b)** phase lo et **(c)** phase liquide-désordonnée.

La présence de Chol dans les membranes phospholipidiques conduit à la formation de la phase fluide lo (**Figure 1.3; b**). Ce concept a été introduit pour la première fois par Ipsen et al. en 1987<sup>31</sup>. La phase lo est un état intermédiaire entre la phase gel et la phase liquide-désordonnée. Les lipides dans la membrane sont ordonnés avec leurs chaînes alkyles en conformation presque toutes trans. Cependant, la bicouche maintient une fluidité analogue à celle de la phase liquide-désordonnée. Les diffusions latérale et rotationnelle sont semblables à celles observées dans la phase liquide-désordonnée ( $2 \text{ à } 12 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ )<sup>30-32</sup>. La formation de la phase lamellaire lo a été liée au caractère ambivalent du Chol. D'un côté, la différence entre la structure de Chol et les phospholipides empêche un empilement hautement compact des chaînes alkyles, ce qui empêche l'obtention de la phase gel. De l'autre côté, la face lisse et hydrophobe de Chol rigidifie les chaînes alkyles des phospholipides dans son voisinage. La solubilité maximale de Chol dans des matrices de phospholipides est généralement entre 30 et 40 (mol) %<sup>33-35</sup>. Cependant, en changeant la méthode de préparation, on a observé une solubilité de 66 et 51 (mol) % de Chol dans les bicouches de PC et de phosphatidyléthanolamine respectivement<sup>34</sup>.

L'augmentation d'ordre, induit par la présence de Chol, dans les bicouches de phospholipides est bien établie; les systèmes comme POPC/Chol<sup>36</sup>, 1-palmitoyl-2-oléoyl-phosphatidyléthanolamine (POPE)/Chol<sup>37</sup> et DMPC/Chol<sup>38</sup> ont été étudiés par la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du <sup>2</sup>H (**Section 1.6.1**). Le profil d'ordre orientationnel

des phospholipides indique des valeurs élevées de paramètres d'ordre. Les mouvements intramoléculaires des chaînes alkyles sont limités. Le grand ordre des chaînes phospholipidiques mène à une bicouche plus épaisse et diminue leur perméabilité. De la même manière, l'ordre des chaînes alkyles de PA a été déterminé en utilisant l'analogue deutéré disponible commercialement<sup>4</sup>. L'étude d'ordre orientationnel le long de PA dans la bicouche PA/Chol montre que ce mélange se classe parmi les bicouches les plus ordonnées découvertes jusqu'à ce jour; ce phénomène explique la grande imperméabilité de ces bicouches<sup>4</sup>.

L'orientation et la dynamique du Chol dans les bicouches amphiphiles monoalkylés/Chol ont été étudiées en utilisant RMN du <sup>2</sup>H. Les mélanges étudiés étaient PA/Chol<sup>39</sup>, 1-(méthylsulfinyl)octadécane/Chol<sup>12</sup>, chlorure de cétylpyridinium/Chol<sup>6</sup> et SA/Chol<sup>5</sup>. Les résultats indiquent que l'orientation et la dynamique du Chol dans ces bicouches sont similaires à celles d'un mélange phospholipidique<sup>5, 40-43</sup>. Le Chol possède un mouvement de symétrie axiale avec l'axe parallèle à *n*. Donc, même si la proportion d'amphiphile monoalkylé pour « solubiliser » le Chol dans la bicouche est limitée, le comportement de Chol dans ces mélanges est semblable au comportement dans les mélanges phospholipides/Chol. Dans le **chapitre 3**, nous avons tenté de former des bicouches orientées magnétiquement pour mesurer la diffusion latérale de PA dans le système lipidique PA/stérol. Ceci permettrait de savoir si la diffusion latérale de PA possède aussi un comportement extrême comme vu pour l'ordre orientationnel.

### 1.5.2. : Interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques permettent un mélange homogène et une bonne hydratation du système. La majorité des mélanges binaires amphiphile monoalkylé/stérol qui forment des bicouches stables ont une de leurs espèces chargée. La répulsion électrostatique entre les molécules chargées est réduite lorsqu'elles sont mélangées avec des molécules neutres, ce qui favorise un mélange homogène<sup>10</sup>. En général, une séparation de phase dans la bicouche est observée lorsque les deux espèces sont neutres ou chargées avec le même signe<sup>3, 5</sup>. En modifiant le pH de l'environnement aqueux, l'amphiphile monoalkylé peut passer d'un état protoné à un état déprotoné et vice-versa. Ainsi, des liposomes, dépendant du pH, ont été développés à partir de mélanges PA/stérol<sup>4</sup> et SA/Chol<sup>5</sup>; l'augmentation de la perméabilité des vésicules induites par un saut de pH est abordée dans le **chapitre 4**.

### 1.5.3. : Morphologie moléculaire

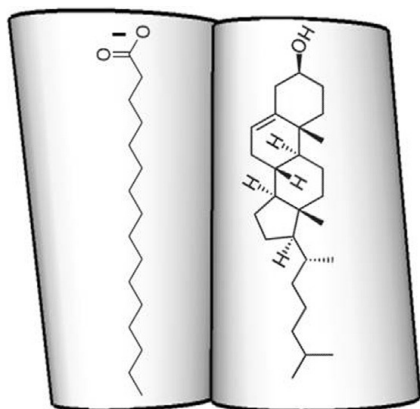
La morphologie des amphiphiles a un impact majeur sur la géométrie de l'auto-assemblage. Israelachvili<sup>13</sup> a développé un modèle qui définit le facteur de forme ( $FF$ ) (**Équation 1.1**).

$$FF = \frac{v}{l_c a_0} \quad \mathbf{1.1}$$

Le  $v$  est le volume de la chaîne alkyle. Le  $l_c$  est la longueur critique de la chaîne hydrophobe. Le  $a_0$  est l'aire de la tête hydrophile. Quand la valeur de  $FF$  est plus basse que 0.5, l'aire de la tête hydrophile est relativement plus grande que la section de la chaîne hydrophobe; le modèle prédit la formation de micelles. Lorsque la valeur de  $FF$  est plus grande que 1, le volume de la chaîne hydrophobe est relativement plus grand que celui de la tête hydrophile; Le  $FF$  prédit la formation des micelles inversées. Et puis, la valeur de  $FF$  entre 0.5 et 1 prévoit la formation de la phase lamellaire. Il est difficile de calculer la valeur de  $FF$  avec une grande précision. Cependant, le modèle permet de prédire de manière semi-quantitative la morphologie de l'auto-assemblage.

Le  $FF$  global de systèmes binaires ou tertiaires doit être autour de 1 pour que la formation de bicouches soit possible. Le  $FF$  de Chol est de 1.08 (valeurs de  $v$ ,  $l_c$  et  $a_0$  sont respectivement  $605 \text{ \AA}^3$ ,  $15.2 \text{ \AA}$  et  $37 \text{ \AA}^2$ )<sup>13</sup>. Les  $FF$  des détergents sont souvent égaux à ou moins que 0.5. Si on suppose que les  $FF$  dans le mélange sont additifs<sup>44-45</sup>, on prédit que le mélange de Chol ( $FF$  légèrement supérieur à 1) et d'amphiphile monoalkylé ( $FF$  inférieur à 1) mène à un  $FF$  compatible avec la formation de bicouches (**Figure 1.4**). Le  $FF$  global du mélange PA/Chol est environ 1 lorsqu'il y a 65-75 (mol) % de Chol. Le mélange PA/Chol (30/70) forme effectivement des bicouches stables comme mentionné précédemment<sup>39</sup>.





**Figure 1.4.** : Représentation schématique de la morphologie de PA déprotoné et de Chol.

## 1.6 : RMN de solide du $^2\text{H}$ et du $^{31}\text{P}$ <sup>41-42, 46-50</sup>

La RMN de solide du  $^2\text{H}$  et du  $^{31}\text{P}$  sont des techniques qui sont utilisées pour étudier la structure, l'orientation et la dynamique des systèmes membranaires<sup>42, 47-50</sup>. Les différents états de la membrane, de l'état solide à l'état liquide isotrope, peuvent être identifiés par différents signaux obtenus par RMN du  $^2\text{H}$  et du  $^{31}\text{P}$ . De plus, l'orientation des structures (par exemple, les bicelles ou les lamelles poreuses) par rapport au champ magnétique externe ( $B$ ) peut être caractérisée. La RMN du  $^2\text{H}$  et du  $^{31}\text{P}$  a été utilisée au **chapitre 3** pour caractériser des bicouches lo orientées magnétiquement.

En présence d'un champ magnétique externe fort, les interactions impliquant le moment magnétique d'un noyau peuvent être décrites par **équation 1.2**.

$$E = E_Z + \Delta E_D + \Delta E_{CSA} + \Delta E_{SC} + \Delta E_Q \quad \mathbf{1.2}$$

$E_Z$  est l'énergie associée à l'effet de Zeeman qui décrit l'interaction entre le moment magnétique du noyau et le champ magnétique; c'est l'interaction dominante. Pour les noyaux de  $^2\text{H}$ ,  $E_Z$  est une énergie d'ordre  $10^7$  à  $10^9$  Hz dans un champ de 7 Tesla<sup>51</sup>.

$\Delta E_{CSA}$  est l'énergie associée à l'anisotropie du déplacement chimique ( $\Delta\sigma$ ). Le déplacement des électrons autour du noyau vient modifier le champ magnétique local ( $B_{Local}$ ) de quelques parties par millions. Comme la densité électronique autour du noyau est généralement anisotrope, cette contribution dépend, dans un solide ou un cristal liquide, de l'orientation de la molécule par rapport au champ magnétique. Le signal d'RMN pour différentes orientations de la molécule par rapport au champ magnétique correspond donc à différentes fréquences<sup>51</sup>. Cet aspect est discuté en détail à la **section 1.6.2** pour RMN du  $^{31}\text{P}$ . En solution, cette contribution est moyennée à une valeur à cause des mouvements rapides des molécules.

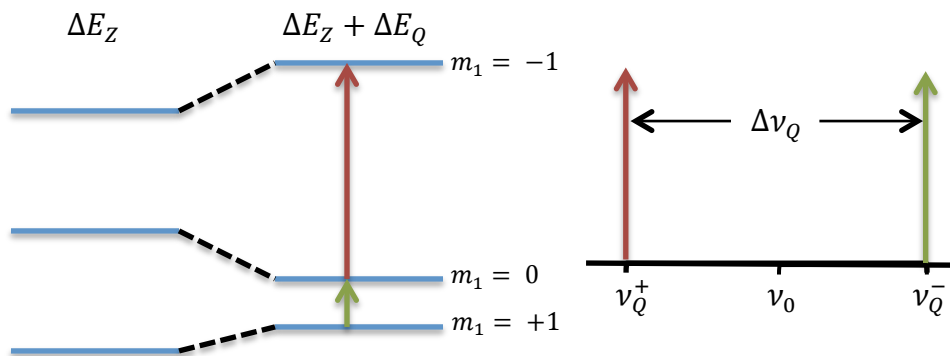
$\Delta E_{SC}$  est l'énergie impliquée dans le couplage spin-spin. Il est l'origine des multiplets dans les conditions isotropes.  $\Delta E_{SC}$  découle du couplage entre les spins nucléaires en présence des électrons impliqués dans les liaisons covalentes. Il est indépendant de l'orientation des molécules par rapport au champ magnétique.  $\Delta E_{SC}$  est généralement négligeable en RMN de solide. Son énergie se trouve entre 0 et  $10^3$  Hz.

$\Delta E_D$  est l'énergie associée à l'interaction dipolaire, une interaction entre les dipôles magnétiques voisins. La valeur de son énergie se trouve entre 0 et  $10^4$  Hz. Cette contribution dépend de la grandeur des moments magnétiques impliqués, de la distance qui les sépare et de l'orientation du segment qui les unit par rapport au champ magnétique. Lors des mouvements rapides isotropes,  $\Delta E_D$  est moyennée à 0 et sa contribution est limitée à l'étape de relaxation. Cependant, en RMN de solide, les couplages dipolaires élargissent les bandes. Dans le présent travail, ces interactions sont rendues nulles grâce à des techniques de découplage des interactions dipolaires.

$\Delta E_Q$  est l'énergie associée à l'interaction quadripolaire. Cette interaction existe seulement pour les noyaux avec des spins plus hauts que  $\frac{1}{2}$ . Les noyaux avec des spins plus grands que  $\frac{1}{2}$  ont un moment quadripolaire électrique ( $eQ$ ) où  $e$  est la charge élémentaire et  $Q$  est le quadripôle qui provient de la distribution non sphérique des charges positives du noyau. Il existe une interaction entre le quadripôle et le gradient des charges électriques. Dans les solutions,  $\Delta E_Q$  est moyennée à 0 à cause des mouvements rapides isotropes. Cependant, elle est observable en RMN de solide; elle peut varier entre 0 et  $10^9$  Hz.

### 1.6.1. : RMN de solide du $^2\text{H}$

Le spin  $I$  du deutérium ( $^2\text{H}$ ) est 1; en conséquence,  $\Delta E_Q$  est présente. Lorsque le spin  $I$  vaut 1, il y a trois niveaux d'énergies Zeeman qui correspondent aux trois orientations du moment magnétique par rapport au champ magnétique (nombre quantique magnétique  $m_1 \in \{-1,0,1\}$ ). La règle de sélection indique que seules les transitions entre deux niveaux d'énergie de spin adjacents sont permises (**Figure 1.5**). Si on tient compte seulement de  $E_Z$ , les deux transitions permises devraient avoir la même énergie et une seule bande d'absorbance devrait être observée. Cependant,  $\Delta E_Q$  modifie légèrement les niveaux d'énergies. Les transitions  $m_1(+1 \rightarrow 0)$  et  $m_1(0 \rightarrow -1)$  n'impliquent alors pas la même énergie (**Figure 1.5**) et on observe un doublet séparé par l'éclatement quadripolaire,  $\Delta\nu_Q$ .



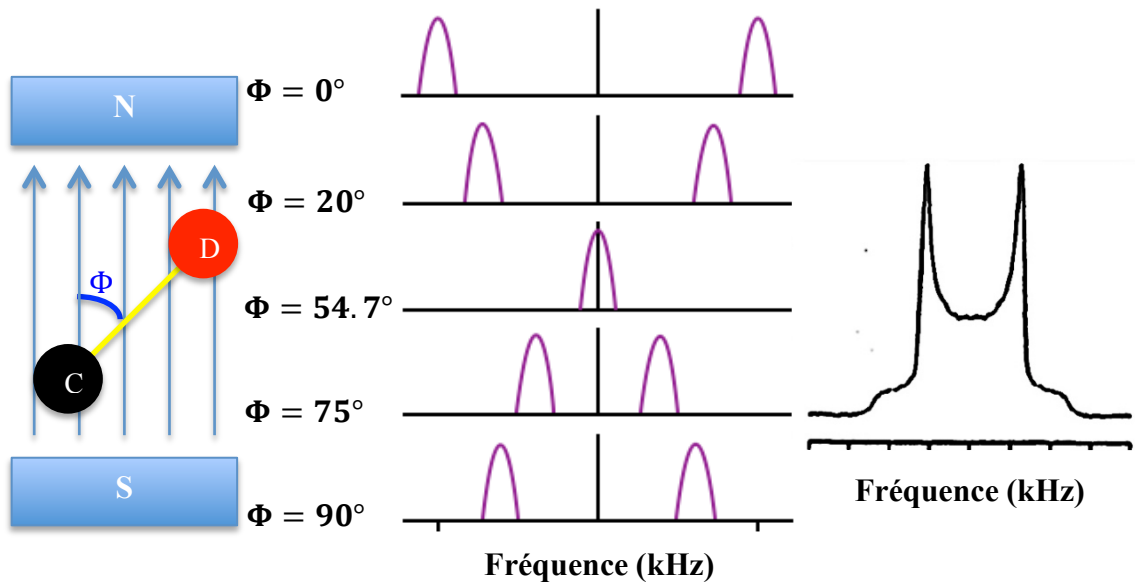
**Figure 1.5.** : Différents niveaux d'énergie et les raies du spectre RMN du  $^2\text{H}$  à l'état solide résultant de la contribution d'interactions quadripolaires où  $\nu_0$  est la fréquence de Larmor<sup>30</sup>.

Pour les chaînes alkyles deutérées, le gradient de champ électrique, associé à la distribution de densité électronique, se trouve le long du lien C-D, à cause de la différence d'électronégativité entre les deux noyaux. Ce champ électrique est axialement symétrique.  $\Delta E_Q$  dépend donc de l'orientation du lien C-D par rapport à la direction du champ magnétique (**Figure 1.6**).  $\Delta\nu_Q$  est alors exprimé par l'équation 1.3.

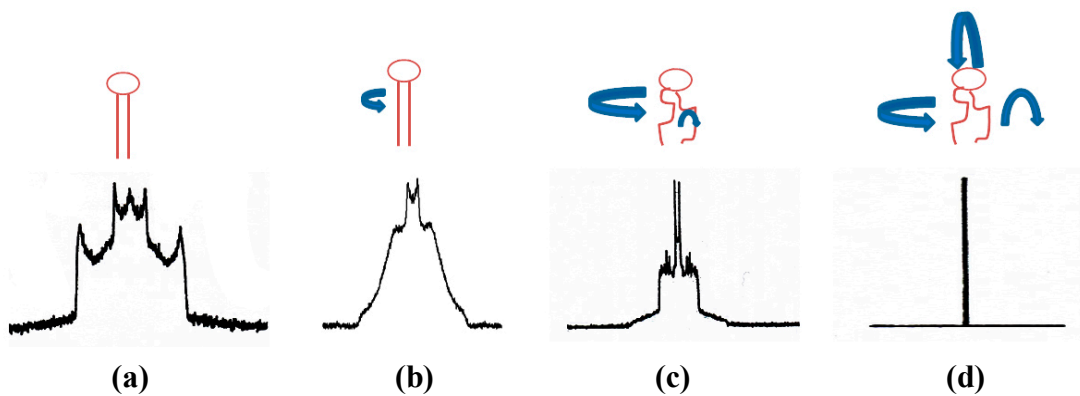
$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2}A_Q \left\langle \frac{3\cos^2\Phi - 1}{2} \right\rangle \quad 1.3$$

Le  $\Phi$  représente l'angle entre le champ magnétique et la liaison C-D (**Figure 1.6**). Le  $A_Q$  est la constante quadripolaire statique. Le signal peut être distribué sur plus de 100 kHz. Les valeurs de  $A_Q$  pour une liaison C-D aliphatique, oléfinique<sup>41</sup> et aromatique sont 170, 175<sup>41</sup> et 193 kHz, respectivement<sup>46</sup>. L'échelle de temps de l'expérience est donc approximativement  $10^{-5}$  s<sup>46</sup>. Les mouvements à l'échelle de temps plus lent n'affectent pas l'amplitude de  $\Delta E_Q$ . Les mouvements à l'échelle de temps plus rapide moyennent  $\Delta E_Q$ .  $\Delta\nu_Q$  varie donc en fonction de  $\Phi$  (**Figure 1.6**). La distribution aléatoire des liaisons C-D dans une poudre résulte en un spectre représentatif des différentes orientations par rapport au champ magnétique, constitué de la superposition des différents doublets (**Figure 1.6; 1.7**). La probabilité que la liaison C-D soit parallèle au champ magnétique est faible (aux pôles d'une sphère), alors, l'intensité du doublet correspondant est basse. Par contre, la probabilité que la liaison C-D soit perpendiculaire au champ magnétique est maximale (sur l'équateur d'une sphère) d'où l'intensité du doublet correspondant est plus grande.

Les spectres correspondant aux différentes symétries d'auto-assemblages sont présentés dans la **figure 1.7**. Dans la phase solide, un signal très large résulte de toutes les chaînes alkyles immobiles. Le signal central correspond aux méthyles terminaux qui, même à l'état solide, possèdent une rotation suffisamment rapide pour causer un moyennage des interactions quadripolaires. En phase lamellaire gel, le signal est moins large parce que les chaînes ont la liberté de rotation autour de l'axe long de la molécule (**a**). Le spectre **c** est typique d'une phase fluide telle que discutée ci-dessous. En solution ou d'une suspension micellaire, les mouvements rapides permettent la réorientation rapide et isotrope des liaisons C-D. Donc, les interactions quadripolaires se moyennent à 0 et un pic fin est observé sur le spectre (**Figure 1.7; d**).



**Figure 1.6.** : Influence de l'orientation de la liaison C-D par rapport au champ magnétique sur les interactions quadripolaires et le spectre de poudre résultant de la superposition de différents doublets associés à différentes orientations.

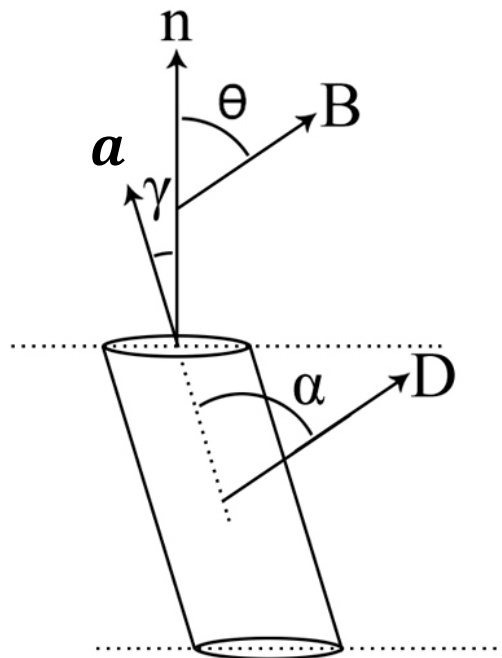


**Figure 1.7.** : Spectre RMN du  $^2\text{H}$  d'amphiphiles deutérés en phase solide (a), en phase lamellaire gel (b), en phase lamellaire fluide (c) et en phase isotrope (solution, micelles, phases cubiques) (d).

Dans une phase lamellaire fluide, les molécules sont plus mobiles. Il y a principalement trois types de mouvements axialement symétriques qui sont présents sur l'échelle de temps de RMN: la rotation autour de l'axe  $\mathbf{a}$ , la fluctuation de la molécule entière par rapport à  $\mathbf{n}$  et l'isomérisation trans-gauche le long de la chaîne alkyle. L'expression de  $\Delta\nu_Q$  qui tient compte de la contribution des trois mouvements est:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2}A_Q \left\langle \frac{3\cos^2\theta-1}{2} \right\rangle \left\langle \frac{3\cos^2\gamma-1}{2} \right\rangle \left\langle \frac{3\cos^2\alpha-1}{2} \right\rangle = \frac{3}{2}A_Q \left\langle \frac{3\cos^2\theta-1}{2} \right\rangle S_{mol}S_{C-D} \quad \mathbf{1.4}$$

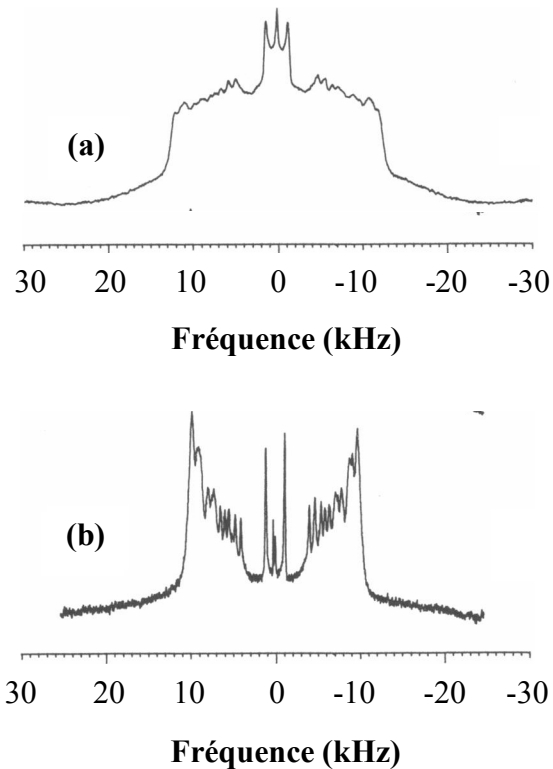
Le  $\alpha$  représente l'angle entre la liaison C-D et l'axe  $\mathbf{a}$ . Le  $\gamma$  représente l'angle entre l'axe  $\mathbf{n}$  et l'axe  $\mathbf{a}$ . Le  $\theta$  représente l'angle entre l'axe  $\mathbf{n}$  et l'axe  $\mathbf{B}$  (**Figure 1.8**). Le terme correspondant à la fluctuation de la molécule entière est représenté par  $S_{mol}$  (paramètre d'ordre moléculaire). Puis, le terme correspondant à l'isomérisation trans-gauche le long de la chaîne alkyle est représenté par  $S_{C-D}$  (paramètres d'ordre orientationnel).



**Figure 1.8.** : Définition des angles  $\theta$ ,  $\gamma$  et  $\alpha$ . L'axe  $\mathbf{n}$  est la normale de la bicouche. Le  $\mathbf{a}$  est le plus long axe de la molécule.

Dans la phase lamellaire fluide, il existe un gradient d'ordre orientationnel : le segment de la chaîne alkyle à proximité de l'interface de la bicouche est plus ordonné que celui situé au milieu de la bicouche. Ainsi, il y a une diminution de  $S_{C-D}$  le long de la chaîne alkyle, de la tête polaire à la queue. La représentation de  $S_{C-D}$  en fonction de la position le long de la chaîne est nommée le profil d'ordre. À proximité de l'interface, le segment où il n'y a pas de variation d'ordre considérable est nommé le plateau. La valeur maximale de  $S_{C-D}$ , qui correspond à chaîne en conformation tout trans, est 0.5 ( $\alpha = 90^\circ$ ). L'ajout de Chol dans une bicouche dans la phase fluide, comme vu dans la **section 1.5.1**, ou la diminution de la température ( $T$ ) provoque une augmentation de l'ordre orientationnel des chaînes.

La superposition de différents doublets associés au gradient d'ordre le long d'une chaîne deutérée résulte en un spectre montré dans la **figure 1.7; c**. Ce spectre de poudre est représentatif de l'orientation aléatoire des molécules dans une poudre. Par exemple, les vésicules multilamellaires de 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine perdeutérée (DMPC-d<sub>54</sub>) sont en phase fluide et leur spectre RMN du <sup>2</sup>H est une superposition de différents doublets associés à différentes orientations (**Figure 1.9; a**)<sup>52</sup>. Un spectre plus simple est obtenu si on a un échantillon orienté (un seul angle  $\theta$  dans l'**équation 1.4**) puisqu'on a alors une superposition de doublets. La **Figure 1.9; b**) présente le spectre RMN du <sup>2</sup>H de bicouches DMPC-d<sub>54</sub> orientées avec leur axe  $n$  perpendiculaire à la direction du champ magnétique<sup>52</sup>. On obtient un spectre de doublets où chacun peut être attribué à un deutéron dans la chaîne alkyle du lipide. Le doublet avec  $\Delta\nu_Q$  le plus grand est attribué au CD<sub>2</sub> attaché au glycérol à l'interface polaire/apolaire et le plus petit  $\Delta\nu_Q$ , au CD<sub>3</sub> en bout de chaîne. Dans ce mémoire, le profil des spectres RMN du <sup>2</sup>H est utilisé pour caractériser des bicouches orientées magnétiquement composées de PA (**Chapitre 3**).



**Figure 1.9.** : Spectre RMN du  $^2\text{H}$  d'une suspension multilamellaire de DMPC- $\text{d}_{54}$  à 40 °C **(a)**<sup>52</sup>. Spectre RMN du  $^2\text{H}$  de bicouches DMPC- $\text{d}_{54}$  orientées magnétiquement avec leur axe  $\mathbf{n}$  à 90° par rapport au champ magnétique à 40 °C **(b)**<sup>52</sup>.

### 1.6.2. : RMN de solide du $^{31}\text{P}$ <sup>53</sup>

Le  $^{31}\text{P}$ , comme le proton, possède un spin  $I$  de  $\frac{1}{2}$ . L'abondance naturelle du noyau actif en RMN est de 100 %<sup>53</sup>. Donc, cette technique ne nécessite pas de marquage d'isotope. Pour les noyaux de spin  $\frac{1}{2}$ ,  $\Delta E_D$  et  $\Delta E_{SC}$  sont souvent éliminés à l'aide du découplage. L'effet prédominant, autre que  $E_Z$ , est  $\Delta E_{CSA}$ . Le champ magnétique local ressenti par le phosphore est réduit par la présence du nuage électronique qui l'entoure. Comme le nuage électronique autour du phosphore n'est pas isotrope, le «déblindage» dépend, de l'orientation de la molécule par rapport au champ magnétique ou, en d'autres termes, de la relation spatiale entre les coordonnées moléculaires et celle du référentiel du laboratoire (l'aimant).



En solution, les rotations rapides (par rapport à l'échelle de temps RMN) des molécules sur elles-mêmes donnent un déplacement chimique moyenné,  $\sigma_{av}$ ; une bande étroite est observée. En phase solide, les molécules sont statiques et donc, l'anisotropie du déplacement chimique est bien visible. Les différentes orientations des molécules donnent différents déplacements chimiques conduisant à une bande large pour une poudre. Le champ magnétique local du noyau phosphore est donné par :

$$B_{Local} = (1 - \sigma)B \quad \mathbf{1.5}$$

où  $\sigma$  est le tenseur statique de déplacement chimique. Dans la bicouche fluide, les interactions avec le champ magnétique sont moyennées par la rotation autour de l'axe  $\mathbf{n}$  (**Figure 1.8**) et  $\sigma$  est alors représenté par un tenseur à symétrie axiale ( $\sigma'$ ) défini par rapport à l'axe  $\mathbf{n}$ . La composante parallèle à l'axe  $\mathbf{n}$  est représentée par  $\sigma_{\parallel}$  et les composantes perpendiculaires sont représentées par  $\sigma_{\perp}$  (**Équation 1.6**).

$$\sigma' = \begin{vmatrix} \sigma_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{\parallel} \end{vmatrix} \quad \mathbf{1.6}$$

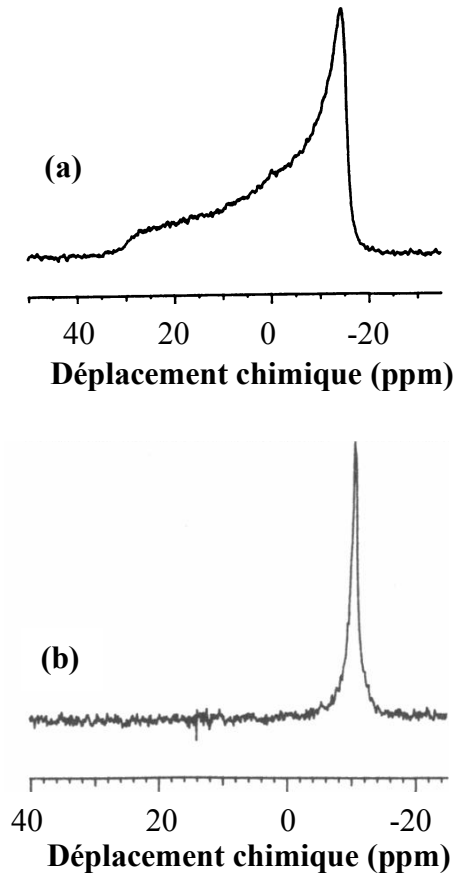
L'anisotropie du déplacement chimique est définie par :

$$\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} \quad \mathbf{1.7}$$

La fréquence de résonance du noyau de phosphore ( $\omega$ ) peut s'exprimer en fonction de  $\theta$  (**Figure 1.9**) (**Équation 1.8**).

$$\omega = \frac{3}{2} \Delta\sigma \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} + \sigma_{av} \quad \mathbf{1.8}$$

Par exemple, le spectre RMN du  $^{31}\text{P}$  de vésicules multilamellaires DMPC-d<sub>54</sub>, un système en phase fluide, est représentatif de l'orientation aléatoire des molécules et de l'anisotropie de déplacement chimique qui en résulte; c'est un spectre de poudre (**Figure 1.10; a**)<sup>52</sup>. Lorsque les bicouches DMPC-d<sub>54</sub> sont orientées avec leur axe  $\mathbf{n}$  perpendiculaire à la direction du champ magnétique; le spectre résultant est composé d'une seule bande (**Figure 1.10; b**)<sup>52</sup>. Dans ce mémoire, le profil des spectres RMN du  $^{31}\text{P}$  est aussi utilisé pour caractériser des bicouches orientées magnétiquement composées de PA (**Chapitre 3**).



**Figure 1.10.** : Spectre RMN du  $^{31}\text{P}$  d'une suspension multilamellaire de DMPC- $\text{d}_{54}$  à 40 °C **(a)**<sup>52</sup>. Spectre RMN du  $^{31}\text{P}$  de bicouches DMPC- $\text{d}_{54}$  orientées magnétiquement avec leur axe  $\mathbf{n}$  à 90° par rapport au champ magnétique à 40 °C **(b)**<sup>52</sup>.

## **1.7. : Contenu du mémoire**

### **1.7.1. : Formation de bicouches lo orientées magnétiquement composées de PA et d'un stérol (Chapitre 3)**

Comme indiqué à la **section 1.5.1**, l'ordre orientationnel le long de la chaîne alkyle des bicouches PA/Chol est très grand, même pour une bicouche en phase lo<sup>39</sup>. Le profil d'ordre orientationnel (**Section 1.6.1**) est typique d'une bicouche. On observe un plateau proche de la tête polaire et une diminution rapide d'ordre orientationnel vers la fin de la chaîne alkyle<sup>54-55</sup>. Cependant, les valeurs de  $S_{C-D}$  sont relativement élevées. Pour les bicouches du mélange PA<sub>d31</sub>/Chol, le  $S_{C-D}$  au niveau du plateau est de  $\sim 0.46$  à 25 °C;<sup>4</sup> comme mentionné plus tôt, la valeur maximale que peut prendre ce paramètre est 0.5. Donc, les chaînes alkyles dans les bicouches PA/Chol sont hautement ordonnées. Le profil d'ordre du système PA/Chol peut être reproduit par des simulations de dynamique moléculaire<sup>56</sup>. Nous nous sommes donc intéressés à déterminer si la diffusion latérale de ce système lipidique possède aussi un comportement extrême. Un des avantages des systèmes orientés est qu'ils permettent de mesurer les propriétés de diffusion des lipides par RMN à gradients pulsés<sup>57</sup>. Dans un premier volet, nous avons donc examiné la possibilité de faire des bicouches lo orientées magnétiquement avec le mélange PA/stérol.

### **1.7.2. : Contrôle de la perméabilité de vésicules composées de PA et de stérol (Chapitre 4)**

Les amphiphiles monoalkylés sont moins coûteux que les phospholipides, d'où l'intérêt de vouloir développer des stérosomes comme vecteur de médicaments. Comme mentionné précédemment (**Section 1.3**), le mélange PA/Chol (30/70) est en phase lamellaire lo stable lorsque le PA est déprotoné ( $\text{pH} \geq 7,5$ )<sup>1</sup>. Il a été montré que ces liposomes libèrent seulement 20 % de la calcéine encapsulée sur une période d'un an<sup>1</sup>. Ces propriétés indiquent que le mélange PA/Chol (30/70) semble être un bon candidat pour être utilisé comme transporteur dans le domaine biologique (ex : transporteur de médicaments). Dans le deuxième volet, le travail consistait à trouver une approche qui permet de moduler la perméabilité des vésicules constituées

d'au moins PA et d'un stérol. Ainsi, si on utilise ces liposomes pour vectoriser un médicament, on pourrait avoir un contrôle sur le temps de sa libération.

### **1.7.3. : Effet des anions, dont la calcéine, sur des bicouches lo chargées positivement composées de SA et Chol (Chapitre 5)**

La stabilité des stérosomes est étroitement liée aux forces électrostatiques entre ses composantes<sup>4-5, 58-59</sup> et on peut considérer que la nature, la grosseur, la charge formelle et la concentration des ions présents en solution peuvent avoir un effet sur la stabilité de ces bicouches<sup>60-61</sup>. La calcéine est fréquemment utilisée comme sonde dans des expériences de perméabilité. Cette approche suppose l'absence d'interaction entre la calcéine et les vésicules. Cependant, les variations observées dans les mesures de perméabilité des liposomes à la calcéine et les difficultés rencontrées pendant leur extrusion nous ont amenés à nous demander si la calcéine, un anion volumineux fortement chargé négativement (-4), pouvait interagir avec les membranes des stérosomes chargés, comme celles formées par des mélanges PA/SChol et PA/SChol/Chol. Le mélange équimolaire SA/Chol (50/50) est chargé et forme des bicouches lo entre 25 et 80 °C tant que le pH du milieu est inférieur au pK<sub>a</sub> de la SA, soit pH < 9.5<sup>5</sup>. Dans le troisième volet, nous avons donc examiné l'impact de la calcéine sur les vésicules SA/Chol chargées positivement à l'aide de calorimétrie différentielle à balayage (DSC, de l'anglais *differential scanning calorimetry*), une technique qui permet une étude thermodynamique du système. L'ampleur de l'impact a été comparée avec ceux d'anions classés dans la série de Hofmeister.

# Chapitre 2

## Matériels et méthodes

### 2.1 : Matériels

Le Chol (> 99 %), le SS (95 %), le SA (99 %), le PA (99 %), le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS) (99 %), l'hydrogénophosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  > 98.5 %), l'acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (MES), l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) (99 %), le OA, le HA, le SC, le Triton X-100 (99 %) et le benzène ont été achetés de Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO, É.-U.). L'acide palmitique perdeutééré (PA-d<sub>31</sub>) (99.3 %) et l'eau légère (> 99.99 %) proviennent de CDN Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada) et d'Isotec (MO, É.-U.) respectivement. La calcéine (hautement purifiée) et la sulforhodamine B (Sulf B) ont été obtenues d'Invitrogen/Life technologies (Eugene, Oregon, É.-U.). Le sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) a été acheté chez Biopharm Inc. (Laval, QC, Canada). Le Sephadex G-50 Medium a été acheté chez Pharmacia (Uppsala, Suède). La POPC, le Schol et la DPHC ont été achetées d'Avanti Polar Lipid (Birmingham, AL, É.-U.), tandis que la DMPC a été obtenue de Northern Lipids Inc. (Vancouver, BC, Canada). Le méthanol (spectrograde) et NaCl (> 99.99 %) ont été obtenus d'American Chemicals Ltd. (Montréal, QC, Canada) et d'Anachemia Chemicals LTD (Vermont, É.-U.) respectivement. Tous les produits et les solvants ont été utilisés sans purification ultérieure.

### 2.2 : Préparation des vésicules multilamellaires

Le mélange lipidique a été préparé en solubilisant les lipides pesés dans un mélange de benzène/méthanol. Le ratio des solvants organiques variait de 95/5 à 75/25 (v/v) dépendamment de la solubilité des lipides. Par la suite, la solution a été gelée dans l'azote liquide et lyophilisée pendant 16 heures pour assurer une sublimation complète des solvants organiques. Puis le mélange lipidique a été hydraté avec une solution tampon dont le pH était entre 5.5 et 8.4 dépendamment du type d'expériences. La suspension a subi cinq cycles gel-dégel, de la température de l'azote liquide à 70 °C. L'échantillon a été vortexé entre chaque cycle pour assurer une bonne hydratation. Finalement, le pH de l'échantillon a été mesuré et réajusté avec

l'addition de solutions diluées de HCl ou NaOH. Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau Milli Q à moins d'avis contraire.

## **2.3 : Mesures de spectroscopie RMN**

### **2.3.1 : Préparation de l'échantillon**

Les vésicules multilamellaires ont été préparées (**Section 2.2**) dans le tampon TRIS (50 mM) contenant du NaCl (140 mM) et de l'EDTA (0.5 mM), à pH 8.4. Pour les expériences de RMN du  $^2\text{H}$ , le PA a été remplacé par le PA- $\text{d}_{31}$  et le tampon était fait dans l'eau légère. La concentration lipidique variait entre 0.03-0.25 g/mL. Chaque fois qu'il est fait mention de la concentration lipidique dans ce mémoire, ceci implique la concentration lipidique totale incluant tous les stérols, les acides gras et les phospholipides utilisés dans le système donné. Le ratio molaire du mélange PA/stérol était gardé constant à 30/70.

### **2.3.2 : Expérience en RMN du $^2\text{H}$**

La suspension lipidique était transférée dans un porte-échantillon en téflon fabriqué par l'atelier de mécanique de l'Université de Montréal. Les spectres étaient enregistrés sur un spectromètre AV-600 de Bruker. La sonde statique utilisée était équipée d'une bobine de 10 mm de diamètre. Les spectres étaient enregistrés avec une séquence d'impulsions conduisant à un écho quadrupolaire, avec l'impulsion à  $90^\circ$  de 2.9  $\mu\text{s}$  et un délai entre les impulsions de 24  $\mu\text{s}$ . Pour chaque spectre, environ 4000 acquisitions étaient enregistrées. Le temps de recyclage était de 0.3 s. La température était contrôlée en utilisant le contrôleur Bruker VT-3000. L'acquisition des données était faite en fonction des températures croissantes. La raie fine correspondant à la phase isotrope a été prise comme la référence à 0 Hz.

### **2.3.3 : Expérience en RMN du $^{31}\text{P}$**

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre AV-600 de Bruker en utilisant une sonde pour rotation à l'angle magique (MAS, de l'anglais *magic angle spinning*) mais sans rotation. La sonde utilisée était équipée d'une bobine de 10 mm de diamètre. La suspension lipidique était transférée dans un porte-échantillon acheté chez Bruker. Les spectres ont été

enregistrés avec une séquence d'impulsions conduisant à un écho, dont l'impulsion à 90° est de 6.25 µs et le délai entre les impulsions de 30 µs. Pour chaque spectre, environ 4000 acquisitions étaient enregistrées. Le temps de recyclage était de 2.5 s. La température était régulée en utilisant le contrôleur VT-3000 de Bruker. L'acquisition des données était menée en fonction de l'augmentation de la température. La raie fine du spectre d'une solution de 85 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a été prise comme référence à 0 ppm du déplacement chimique.

## **2.4 : Mesures de perméabilité**

### **2.4.1 : Préparation de l'échantillon**

Des procédures basées sur les propriétés d'autoextinction d'un fluorophore à haute concentration ont été servies à faire les mesures de perméabilités<sup>62-63</sup>. La concentration lipidique finale des vésicules multilamellaires était ~16 mg/mL (**Section 2.2**). Pour ces expériences, elles ont été préparées dans un tampon contenant le fluorophore (tampon interne). Les deux fluorophores utilisés étaient la calcéïne (80 mM) et la Sulf B (50 mM)).

Après la formation des vésicules multilamellaires, les vésicules unilamellaires ont été préparées par extrusion en utilisant une extrudeuse manuelle Liposofast (Avestin, Ottawa, ON Canada). La dispersion a été passée à travers deux filtres de polycarbonate empilés (pores à 100 nm) à la température ambiante, (sauf quand il y avait de SChol dans le mélange lipidique où la température était alors 70 °C). Les vésicules unilamellaires contenant le fluorophore ont été séparées du fluorophore libre par chromatographie d'exclusion stérique en utilisant un gel Sephadex G-50 Medium (diamètre de la colonne : 1.5 cm, longueur : 25 cm). La solution tampon d'éluion (tampon externe) avait le même pH et la même osmolalité que le tampon interne. Pour faire une mesure, une aliquote des vésicules récoltées était diluée 100 fois dans le tampon externe préparé au pH désiré.

### **2.4.1.1 : Relargage passif**

Pour les mesures de relargage passif des liposomes, le tampon interne contenant la calcéine (80 mM) incluait le TRIS (50 mM), le NaCl (10 mM) et l'EDTA (0.5 mM). Le tampon externe était composé de TRIS (50 mM), NaCl (140 mM) et EDTA (0.5 mM). Le pH des solutions tampons était de 8.4.

### **2.4.1.2 : Relargage induit par une variation de pH**

Pour les mesures de relargage de la calcéine induit par la variation de pH, le tampon interne contenant la calcéine (80 mM) incluait le TRIS (50 mM), le MES (50 mM), le NaCl (10 mM) et l'EDTA (0.5 mM), pH 5.5. Les tampons externes étaient composés de TRIS (50 mM), MES (50 mM), NaCl (130 mM) et EDTA (0.5 mM). Le tampon externe utilisé lors de la dilution était préparé à pH 5.5 et à 7.4.

Pour les mesures de relargage de la Sulf B induit par la variation de pH, le tampon interne contenant la Sulf B (50 mM) incluait le TRIS (50 mM), le MES (50 mM), le NaCl (70 mM) et l'EDTA (0.5 mM), pH 5.5. Les tampons externes étaient composés de TRIS (50 mM), MES (50 mM), NaCl (130 mM) et EDTA (0.5 mM). Le pH du tampon externe était préparé à pH 5.5 et à 7.4.

## **2.4.2 : Expérience de fluorescence**

L'intensité de fluorescence était mesurée avec un spectrofluorimètre de Photon Technology International (New-Jersey, É-U). Dans le cas de la calcéine, la longueur d'onde d'excitation et d'émission étaient respectivement 490 et 513 nm. Dans le cas de la Sulf B, la longueur d'onde d'excitation et d'émission étaient respectivement 565 et 584 nm. La largeur de bande passante utilisée pour le monochromateur d'excitation et d'émission était respectivement 1.0 et 1.6 nm.



### 2.4.2.1 : Relargage passif

Pour étudier le relargage passif, une aliquote a été prélevée de la suspension tout de suite après sa dilution avec le tampon externe. Une mesure de fluorescence a été prise avec cette aliquote avant ( $I_i$ ) et après ( $I_{i+T}$ ) l'ajout de Triton X-100 (10  $\mu$ L d'une solution 10 (v/v) % préparée dans l'eau Milli Q). Le  $I_i$  représentait l'intensité initiale, lorsque toute la sonde était encapsulée dans les liposomes (à  $t_0$ ). Le  $I_{i+T}$  représentait l'intensité lorsque que toute la sonde des liposomes utilisés pour la mesure de  $I_i$  était relarguée. Après un certain temps d'incubation ( $t$ ), l'intensité de la fluorescence de la sonde était mesurée avec une autre aliquote de la même suspension. Les mesures ont été prises avant ( $I_f$ ) et après ( $I_{f+T}$ ) l'addition de Triton X-100. Le pourcentage de la sonde relarguée des vésicules à un temps  $t$  était calculé avec l'équation 2.1.

$$\% \text{ de relargage} = 100 - \left( \left( \frac{I_{f+T} - I_f / I_{f+T}}{I_{i+T} - I_i / I_{i+T}} \right) \times 100 \right) \quad 2.1$$

### 2.4.2.2 : Relargage induit par la variation de pH

Dans le cas du relargage induit par la variation de pH, le pourcentage de relargage de la sonde a aussi été calculé avec l'équation 2.1. Par contre,  $I_i$  et  $I_{i+T}$  ont toujours été pris à pH 5.5, peu importe si l'expérience a été menée à pH 5.5 ou 7.4. Le  $I_i$  représentait l'intensité de fluorescence dans les conditions où toute la sonde est encapsulée dans les liposomes; les liposomes, à pH 7.4, relargaient la sonde trop rapidement pour prendre une telle mesure.

Si la libération du fluorophore induite par la variation de pH était rapide (moins de 20 minutes), le profil de relargage a été enregistré en continu, débutant immédiatement après la dilution des vésicules unilamellaires. Le Triton X-100 était ajouté à la fin des mesures. Le pourcentage de relargage de la sonde est obtenu par la formule simplifiée, l'équation 2.2.

$$\% \text{ de relargage} = 100 - \left( \left( \frac{I_T - I_f}{I_T - I_i} \right) \times 100 \right) \quad 2.2$$

## 2.5 : Mesures de calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les mesures de calorimétrie ont été effectuées sur des vésicules unilamellaires, préparées dans un tampon TRIS 5 mM à pH 7.4 selon le protocole décrit à la **section 2.4.1**. La concentration lipidique de la suspension était  $\sim 4$  mg/mL. Les quatre solutions mères d'ions utilisées pour faire les dilution subséquentes étaient de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1 M),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.2 M), NaCl (3 M) et calcéine (80 mM). Les concentrations finales d'ions dans la suspension lipidique étaient déterminées de manière à avoir une force ionique équivalente (sauf dans le cas de calcéine).

Les thermogrammes ont été enregistrés avec un microcalorimètre VP-DSC (MicroCal, Northampton, MA), opéré par le logiciel Origin (MicroCal Software, Northampton, MA, USA). Le mélange de la suspension lipidique avec la solution d'ions a été fait directement dans la cellule du calorimètre. La cellule était remplie avec 300  $\mu\text{L}$  de la suspension lipidique et 100  $\mu\text{L}$  de la solution d'ion étudié. La cellule de référence était remplie avec 300  $\mu\text{L}$  de la solution tampon TRIS (5 mM) et 100  $\mu\text{L}$  de la solution d'ion étudié. Dans une première étape, 5 cycles aller-retour entre 25 °C à 90 °C avec une vitesse de 90 °C/h étaient effectués afin d'homogénéiser le système. Dans une deuxième étape, les thermogrammes ont été enregistrés lors de 5 cycles aller-retour entre 25 °C à 90 °C avec une vitesse de 40 °C/h. Le traitement des données a été fait avec le logiciel OriginPro 8 SR0 (Northampton, MA, USA).

## 2.6 : Mesures de la diffusion dynamique de la lumière (DLS)

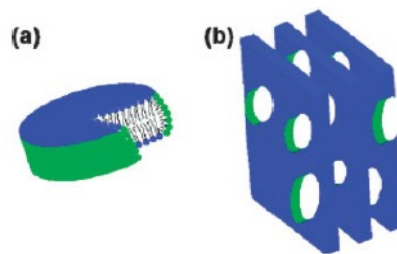
Après l'extrusion, la taille des vésicules et leur index de polydispersité (PDI, de l'anglais *polydispersity Index*) ont été mesurés par la diffusion dynamique de la lumière (DLS, de l'anglais *Dynamic Light Scattering*) avec un appareil Zetasizer (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Royaume-Uni).

## Chapitre 3

### Formation de bicouches lo orientées magnétiquement composées d'acide palmitique et d'un stérol

#### 3.1 : Introduction

À l'origine<sup>53</sup>, le terme « bicelle » vient décrire un auto-assemblage fait d'un fragment discoïdal de bicouche, de la taille d'une micelle, dont les côtés sont protégés de l'environnement aqueux par des molécules amphiphiles (**Figure 3.1; a**). Dans la littérature, le mélange le plus commun pour faire des bicelles est composé de DMPC et de DPHC<sup>64</sup>. La DMPC pure, qui possède 14 atomes de carbone sur chacune de ses deux chaînes, forme des vésicules. Pour former des bicelles, on y ajoute de la DHPC qui a des chaînes plus courtes, avec 6 atomes de carbone sur chacune des deux chaînes. La DMPC s'auto-assemble pour former la bicouche et la DHPC se place au pourtour du fragment discoïdal (**Figure 3.1**). Des études ont montré que les mélanges DMPC/DHPC donnent lieu à différentes morphologies d'auto-assemblages. En plus des bicelles, ces mélanges peuvent par exemple, former des lamelles poreuses (**Figure 3.1; b**)<sup>53</sup>.

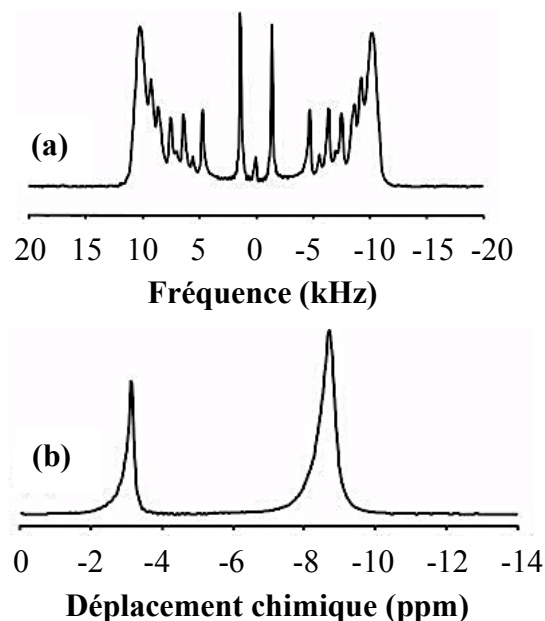


**Figure 3.1.** : Une bicelle (a) et des lamelles poreuses (b)<sup>53</sup>.

Plusieurs paramètres jouent un rôle dans la formation de bicelles ou de lamelles poreuses à base de DMPC/DHPC : la température, la concentration de sel dans le milieu aqueux, la concentration lipidique, la densité de charge de la membrane, la proportion de Chol dans le mélange lipidique et le ratio DMPC/DHPC<sup>53, 65</sup>. Le rapport entre l'aire totale occupée par l'amphiphile à longues chaînes ( $A_{LC}$ ) et celle de l'amphiphile à courtes chaînes ( $A_{CC}$ ) joue un rôle important dans la formation de ces structures.

Ces bicelles ou lamelles poreuses peuvent s'orienter spontanément sous l'influence d'un champ magnétique supérieur à 1 Tesla<sup>53</sup>. Leur alignement magnétique dépend de l'anisotropie de la susceptibilité magnétique des bicouches de phospholipides,  $\Delta\chi$ . Un signe négatif de  $\Delta\chi$  indique que la bicouche s'oriente avec l'axe  $\mathbf{n}$  perpendiculaire au champ magnétique appliqué tandis qu'un signe positif indique que l'axe  $\mathbf{n}$  de la bicouche est parallèle au champ magnétique appliqué. Le degré d'alignement de bicouches dépend de plusieurs facteurs<sup>64</sup> incluant la grandeur du champ magnétique, la magnitude de  $\Delta\chi$ , la viscosité du milieu, la présence des lanthanides et la température. Selon la littérature, un ratio DMPC/DHPC inférieur à 1.9 mène à des bicelles, qui cependant ne s'orientent pas dans le champ magnétique<sup>65</sup>. Dans la littérature, les ratios DMPC/DHPC les plus souvent utilisés pour former des bicouches orientées se trouvent entre 2.0 et 4.5<sup>65</sup>.

Comme expliqué dans la **section 1.6.1**, la RMN solide du  $^2\text{H}$  et du  $^{31}\text{P}$  sont souvent utilisés pour caractériser les bicouches qui s'orientent magnétiquement. Les spectres RMN du  $^2\text{H}$  et du  $^{31}\text{P}$  de bicouches DMPC/DHPC (ratio 2.70) orientées avec l'axe  $\mathbf{n}$  perpendiculaire au champ magnétique, à 37 °C, sont montrés dans la **figure 3.2**<sup>53</sup>. Dans le cas de RMN du  $^2\text{H}$ , chaque doublet peut être attribué à un deutérium dans la chaîne alkyle du lipide (**Figure 3.2 ; a**)<sup>53</sup>. Dans le cas de RMN du  $^{31}\text{P}$ , on observe plutôt un spectre caractéristique composant de deux bandes (**Figure 3.2 ; b**)<sup>53</sup>. La bande avec le plus grand déplacement chimique appartient à la DMPC et l'autre, à la DHPC<sup>66-68</sup>.



**Figure 3.2.** : Spectre RMN du  $^2\text{H}$  de DMPC- $\text{d}_{27}$ /DHPC (ratio = 3.55), avec une concentration lipidique de 0.2 g/mL à 37 °C **(a)**<sup>53</sup>. Spectre RMN du  $^{31}\text{P}$  de DMPC/DHPC (ratio 2.70), avec une concentration lipidique de 0.2 g/mL à 37 °C **(b)**<sup>53</sup>.

La diffusion de PA dans les mélanges PA/Chol peut être mesurée par RMN à gradients pulsés si leurs bicouches s'orientent magnétiquement<sup>57</sup>. Le but du présent chapitre est d'arriver à la formation de bicouches lo qui s'orientent sous l'influence d'un champ magnétique avec un mélange lipidique principalement composé de PA et d'un stérol (30/70).

### 3.1.1 : Les approches

En s'inspirant du système DMPC/DHPC, la première approche utilisée pour faire des bicouches qui s'orientent dans un champ magnétique avec le mélange de PA (une chaîne à 16 carbones) et de Chol est d'y ajouter de HA (une chaîne 6 carbones) (**Figure 1.2**). La composition molaire de PA/Chol/HA utilisé était 25/57/18. Le ratio 30/70 de PA/Chol est gardé constant dans ce mélange lipidique. Comme indiqué plus tôt, le  $A_{CL}/A_{CC}$  joue un rôle important dans la formation de bicouches qui s'orientent magnétiquement<sup>65</sup>. Nous avons sélectionné un ratio de 3.4, une valeur entre 2.0 et 4.5 qui balisent la formation de bicouches orientées. Ce dernier a été déterminé en tenant compte de la contribution du Chol qui s'insère entre les amphiphiles à

longues chaînes (PA). Dans les mélanges lipidiques pour lesquels le pourcentage de Chol ne dépasse pas 20 (mol) %, la contribution de Chol ne modifie pas l'aire du film<sup>69</sup>. La présence de Chol rend la bicouche plus compacte; la diminution d'aire de l'amphiphile est compensée par l'aire occupée par les molécules de Chol<sup>69</sup>. Cependant, dans notre cas, la contribution de Chol dans le mélange lipidique ne peut pas être négligée. Comme l'aire interfaciale de PA ( $\sim 21 \text{ \AA}^2$ )<sup>70</sup> et de Chol ( $\sim 30 \text{ \AA}^2$ )<sup>69</sup> sont similaires, le rapport  $A_{CL}/A_{CC}$  a été déterminé comme suit :  $[X_{PA} + (X_{Chol} - 0.2)]/X_{HA}$ ,  $X$  étant la fraction molaire des composés indiqués.

Un problème potentiel avec l'insertion de HA dans la bicouche est que sa solubilité dans l'eau est plus grande que celle de DHPC. Afin de favoriser l'insertion de l'amphiphile à courtes chaînes dans l'auto-assemblage, nous avons aussi étudié le mélange PA/Chol/DHPC comme deuxième approche. La proportion molaire de PA/Chol/DHPC choisi était 26/60/14. Le ratio PA/Chol a été maintenu à 30/70. La DHPC (deux chaînes/molécule), a une aire interfaciale de  $\sim 65 \text{ \AA}^2$ <sup>71</sup>, ce qui est approximativement le double de celle de PA (une chaîne/molécule). Donc, le rapport  $A_{CL}/A_{CC}$  utilisé était  $\frac{[\frac{1}{2}(X_{PA} + (X_{Chol} - 0.2))]}{X_{DHPC}} = 2.4$ , ce qui est une valeur entre 2.0 et 4.5.

La troisième approche utilisée pour former des bicouches orientées magnétiquement a été de modifier progressivement un système connu pour former des bicelles de manière à s'approcher des mélanges PA/stérol qui nous intéressent. Nous avons débuté par le système DMPC/DHPC, avec un ratio 3.5 déjà étudié dans la littérature<sup>72</sup>. Ensuite, on a ajouté à ce mélange, en premier lieu, du Chol et observé si cela mène à la formation de bicouches orientées magnétiquement. La composition molaire de DMPC/DHPC/Chol utilisé était 67/19/14, maintenant un ratio DMPC/DHPC à 3.5. Le pourcentage de Chol était 20 (mol) % par rapport à la DMPC, ce qui correspond, selon la littérature, à la quantité maximale de cholestérol dans des bicouches qui s'orientent<sup>73-74</sup>. Nous avons aussi étudié un deuxième stérol, le SS. Il est intéressant d'étudier ce stérol parce que des études précédentes du groupe révèlent que les bicouches lo formées par le mélange PA-d<sub>31</sub>/SS (30/70) montrent une tendance à s'orienter sous l'influence du champ magnétique<sup>4</sup>. L'approche utilisée pour le Chol a été appliquée avec le SS. Donc, le premier pas était de savoir s'il était possible de faire des bicouches orientées magnétiquement avec le mélange DMPC/DHPC/SS. La composition molaire des deux mélanges DMPC/DHPC/SS étudiés était 72/21/7 et 67/19/14. Les pourcentages en stérol étaient 10 (mol) % et 20 (mol) %

respectivement, si on ne tient compte que de DMPC et SS, les composantes qui devraient se trouver dans la partie lamellaire de l'auto-assemblage.

## 3.2 : Résultats et discussion

Premièrement, l'ajout de HA dans le mélange PA-d<sub>31</sub>/Chol a été étudié dans le but de former des bicouches qui s'orientent sous l'influence du champ magnétique. L'orientation a été examinée par RMN du <sup>2</sup>H pour le mélange PA-d<sub>31</sub>/HA/Chol (25/18/57). Pour fin de comparaison, le mélange PA-d<sub>31</sub>/Chol (30/70) a aussi été préparé à une concentration lipidique de 0.03 g/mL. Comme rapporté précédemment<sup>39</sup>, le spectre du mélange PA-d<sub>31</sub>/Chol (30/70) à 25 °C et à pH 8.4 (**Figure 3.3; a**) indique l'existence d'une phase lamellaire l<sub>o</sub>. Le spectre PA-d<sub>31</sub>/HA/Chol (25/18/57) (**Figure 3.3; b**) à une concentration lipidique de 0.03 g/mL, pH 8.4 et 25 °C, est très semblable au spectre obtenu pour PA-d<sub>31</sub>/Chol (30/70) (**Figure 3.3; a**) et n'est donc pas caractéristique de bicouches orientées (**Figure 3.2; a**). Une hypothèse qui expliquerait ce résultat est que le HA est partiellement solubilisé dans le milieu aqueux et que sa quantité dans la bicouche soit insuffisante pour introduire la formation de bicouches orientées.

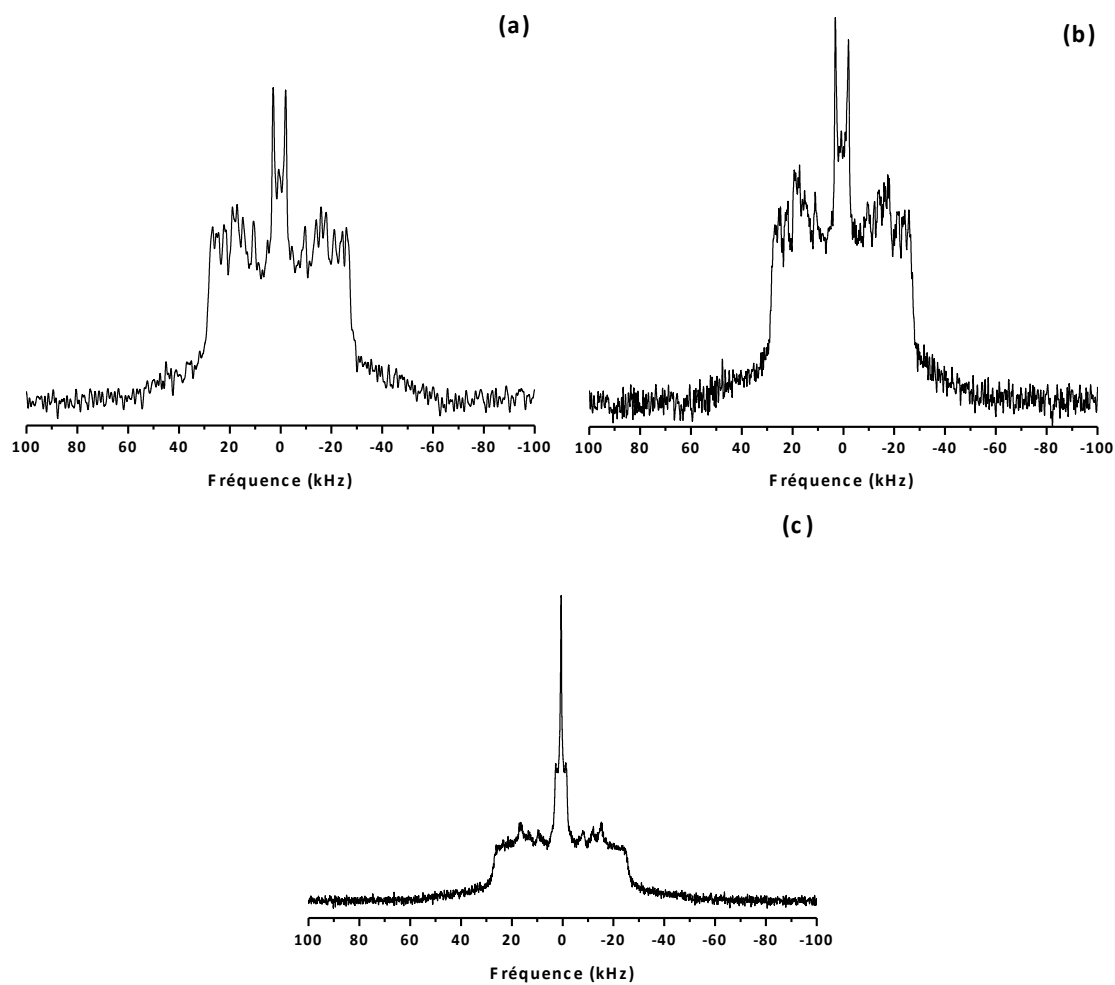
Deuxièmement, l'ajout de DHPC dans le mélange PA/Chol a été tenté pour favoriser la formation de bicouches orientées magnétiquement. Le mélange PA-d<sub>31</sub>/DHPC/Chol (26/14/60) à une concentration lipidique de 0.1 g/mL a été étudié à pH 8.4 et à 25 °C (**Figure 3.3; c**). Le spectre RMN du <sup>2</sup>H obtenu du mélange est très semblable à celui du spectre PA-d<sub>31</sub>/Chol (30/70), typique d'une phase lamellaire l<sub>o</sub> orientée aléatoirement. La principale différence est la présence d'une bande fine à 0 kHz. Cette raie fine indique qu'une certaine quantité de PA deutéré se trouve dans une phase isotrope, qui pourrait être des micelles ou des bicelles orientées de manière isotrope.

Comme mentionné plus tôt, la température est un facteur qui influence la formation de bicouches orientées magnétiquement dans le mélange DMPC/DHPC. Pour une concentration lipidique de 0.1 g/mL, les auto-assemblages DMPC/DHPC (ratio 3.2) s'orientent magnétiquement seulement entre 30 et 50 °C<sup>53</sup>. Pour vérifier s'il est possible qu'un domaine de température conduise à l'orientation de bicouches, le spectre du mélange PA-d<sub>31</sub>/DHPC/Chol (26/14/60) a été enregistré à plusieurs températures entre 25 et 80 °C. Les spectres étaient tous semblables (**Figure 3.3; c**) (spectres non montrés). La composante du spectre correspondant à la phase

lamellaire lo ne montre pas les caractéristiques de bicouches orientées. La seule différence observée entre les spectres était une diminution de leur largeur avec l'augmentation de la température, ce qui s'explique par l'augmentation d'agitation thermique<sup>36</sup>. En augmentant la température, l'isomérisation trans-gauche est plus fréquente et cause un moyennage additionnel des interactions quadripolaires.

La littérature indique que le mélange DMPC/DHPC s'oriente sous l'influence du champ magnétique pour des concentrations lipidiques, entre 0.0025 à 0.25 g/mL<sup>65</sup>. À plus basse concentration lipidique, la formation de vésicules multilamellaires a été observée pour une température supérieure à 25 °C selon le diagramme température-concentration lipidique<sup>65</sup>. De plus, comme mentionné plus haut, le ratio longues chaînes/courtes chaînes joue aussi un rôle important<sup>65</sup>. Alors, le mélange PA-d<sub>31</sub>/DHPC/Chol a été étudié en augmentant la concentration lipidique à 0.2 g/mL et en augmentant le pourcentage de DHPC pour s'assurer qu'il y ait assez de courtes chaînes dans le mélange. Donc, le mélange PA-d<sub>31</sub>/DHPC/Chol (21/30/49) a été étudié à différentes températures pour déterminer si ces deux facteurs favorisent la formation de bicouches qui s'orientent magnétiquement. Les spectres étaient semblables à celui du mélange PA-d<sub>31</sub>/DHPC/Chol (26/14/60) à 25 °C (**Figure 3.3; c**) encore une fois (spectres non montrés). Alors, l'ajout de DHPC dans le mélange PA-d<sub>31</sub>/Chol (30/70) n'a pas mené à la formation de bicouches orientées magnétiquement.

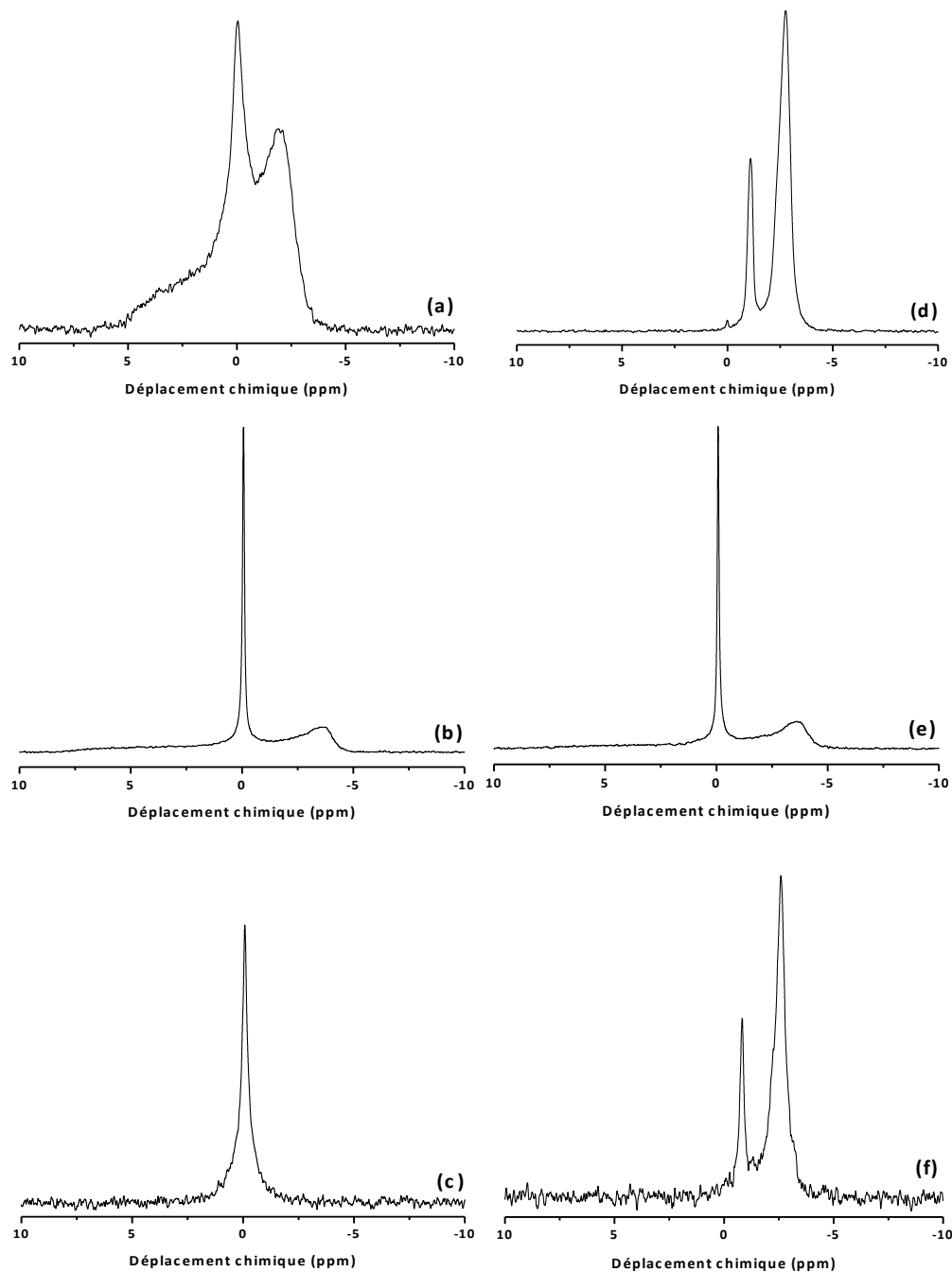




**Figure 3.3.** : Spectres de RMN du  $^2\text{H}$  à 25 °C à pH ~ 8.4, du mélange PA- $\text{d}_{31}$ /Chol (30/70) à une concentration lipidique de 0.03 g/mL **(a)**, PA- $\text{d}_{31}$ /HA/Chol (25/18/57) à 0.03 g/mL **(b)** et PA- $\text{d}_{31}$ /DHPC/Chol (26/14/60) à 0.1 g/mL **(c)**.

Nous avons tenté une troisième approche afin de créer des bicouches majoritairement de PA/Chol magnétiquement orientées. Il est déjà établi dans la littérature que le système DMPC/DHPC forme des bicouches orientées. Nous avons modifié le système DMPC/DHPC et ajouté des composantes afin de nous rapprocher de notre système. D'abord, le mélange DMPC/DHPC (78/22) (ratio 3.5) a été étudié dans le but d'avoir une référence. La **figure 3.4; a** montre le spectre RMN du  $^{31}\text{P}$  de DMPC/DHPC (78/22) à 25 °C. Le spectre est composé d'un profil typique d'une phase lamellaire non orientée<sup>67, 75-76</sup> et d'une bande fine à 0 ppm (**Tableau 3.1**). Ce dernier signal, typique d'une phase isotrope, suggère qu'une portion des phospholipides se retrouve sous forme de micelles ou des bicelles non-orientées. Par contre, le spectre du mélange DMPC/DHPC (78/22) à 40 °C montre deux bandes avec des déplacements chimiques de -4.6 et -11.4 ppm (**Figure 3.4; d**) (**Tableau 3.1**). Selon la littérature, des bandes vers -3.5 et -9 ppm<sup>72</sup> sont caractéristiques de bicouches orientées avec leur axe  $n$  perpendiculaire au champ magnétique. La concordance de la position des bandes trouvées nous indique la présence des bicouches orientées.

Le mélange DMPC/DHPC/Chol (67/19/14) a été étudié dans le but d'observer l'effet du Chol sur la formation de bicouches orientées. La **figure 3.4; b, e** montre les spectres de RMN du  $^{31}\text{P}$  de DMPC/DHPC/Chol (67/19/14) à 25 et à 40 °C. Les spectres montrent la coexistence d'une phase lamellaire non orientée<sup>67, 75-76</sup> et d'une bande fine à 0 ppm. Il y n'a pas d'indication de la formation de bicouches orientées magnétiquement. Le Chol défavorise donc la formation de bicouches magnétiquement orientées à 40 °C. Dans la littérature, des lanthanides sont systématiquement ajoutés aux mélanges lipidiques incluant du Chol afin d'induire l'orientation sous l'influence du champ magnétique<sup>64</sup>. L'absence de lanthanides dans notre système peut expliquer la difficulté exercée par les bicouches comportant du Chol à s'orienter. De plus, dans les membranes phospholipidiques orientées, le pourcentage molaire de Chol ne dépasse jamais 20 (mol) %<sup>64</sup>. Alors, il est fort probable qu'il ne soit pas possible de former des bicouches qui s'orientent sous l'influence du champ magnétique avec le mélange PA/Chol (30/70) à cause du grand pourcentage de Chol dans ce mélange lipidique.



**Figure 3.4.** : Spectres de RMN du  $^{31}\text{P}$  à 25 °C de DMPC/DHPC (78/22) à 0.25 g/mL **(a)**, à 25 °C de DMPC/DHPC/Chol (67/19/14) à 0.25 g/mL **(b)**, à 25 °C de DMPC/DHPC/SS (72/21/7) à 0.25 g/mL **(c)**, à 40 °C de DMPC/DHPC (78/22) à 0.25 g/mL **(d)**, à 40 °C de DMPC/DHPC/Chol (67/19/14) à 0.25 g/mL **(e)** et à 40 °C de DMPC/DHPC/SS (72/21/7) à 0.25 g/mL **(f)**.

Tableau 3.1. : Position des bandes des spectres RMN du $^{31}\text{P}$ de différents mélanges lipidiques.							
Composition				pH	Concentration lipidique (g/mL)	T (°C)	Position des maximum(s) des spectres (ppm)
DMPC (mol) %	DHPC (mol) %	SS (mol) %	Chol (mol) %				
78	22	-	-	8.6	0.25	25	0 - -7.7
						40	0 -4.6 -11.4
						50	0 - -14.7
						60	0 - -14.8
						70	0 - -14.5
67	19	-	14	8.3	0.25	25	0 - -14.9
						40	0 - -14.8
						50	0 - -14.5
						60	0 - -14.0
						70	0 - -13.1
72	21	7	-	8.6	0.25	25	0 - -
						40	- -3.4 -10.6
						50	- -5.3 -11.4
						60	0 - -14.4
						70	0 - -14.1
67	19	14	-	8.4	0.25	25	0 - -14.7
						40	0 -2.3 -8.5
						50	0 -3.6 -9.4
						60	0 - -14.1
						70	0 - -13.9

Nous avons alors opté pour le SS, un stérol ayant déjà montré une tendance à orienter les bicouches<sup>4</sup>. La première expérience consistait à déterminer si le mélange DMPC/DHPC/SS (72/21/7) peut former des bicouches orientées magnétiquement. Son spectre RMN du <sup>31</sup>P à 25 °C présente une seule bande fine centrée à 0 ppm (**Tableau 3.1 et Figure 3.4; c**). Il est donc possible qu'il y ait formation de bicelles orientées aléatoirement avec ce mélange lipidique à 25 °C. À 40 et à 50 °C (**Tableau 3.1 et Figure 3.4; f**), les spectres RMN du <sup>31</sup>P montrent la présence de deux bandes à des déplacements chimiques négatifs. À 40 °C, on observe les bandes à -3.4 ppm et à -10.6 ppm. À 50 °C, elles sont à -5.3 et à -11.4 ppm. Ces bandes indiquent la présence des bicouches orientées avec leur axe *n* perpendiculaire à la direction du champ magnétique<sup>67, 72</sup>.

Suite à ce résultat intéressant, nous avons augmenté le pourcentage de SS dans le mélange DMPC/DHPC/SS, afin d'obtenir la proportion 67/19/14. À 25 °C, une seule raie fine à 0 ppm est observée (**Tableau 3.1**). Il est possible qu'on soit en présence des bicelles orientées aléatoirement. Les spectres à 40 et 50 °C montrent deux bandes à des déplacements chimiques négatifs : à -2.3 ppm et à -8.5 ppm à 40 °C et à -3.6 ppm et à -9.4 ppm à 50 °C. On retrouve aussi une bande fine à 0 ppm mais elle correspond à moins que 1 % du signal total (**Tableau 3.1**). La position des bandes indique la présence des bicouches orientées magnétiquement<sup>67, 72</sup>. La présence de SS dans le mélange DMPC/DHPC, à deux compositions différentes, n'empêche pas la formation de bicouches magnétiquement orientées.

### 3.3 : Conclusion

Le premier objectif, qui consistait à former des bicouches PA/stérol qui s'orientent magnétiquement n'a pas été atteint. D'abord, nous avons montré que la présence de Chol en grande quantité dans le mélange lipidique empêchait la formation de bicouches orientées magnétiquement. Cependant, l'ajout de SS n'empêche pas la formation de bicouches orientées magnétiquement.

Pour les travaux futurs, il serait intéressant d'ajouter de PA dans le mélange DMPC/DHPC/SS et observer s'il mène à la formation de bicouches orientées magnétiquement. Il est possible que nous puissions obtenir des bicouches PA/SS qui s'orientent magnétiquement avec une certaine proportion de lipide à courtes chaînes. Alors, il serait possible de mesurer la

diffusion latérale dans la bicouche composée de PA/stérol (30/70). Une autre piste serait d'étudier le mélange DMPC/DHPC/Chol en présence des lanthanides.

## Chapitre 4

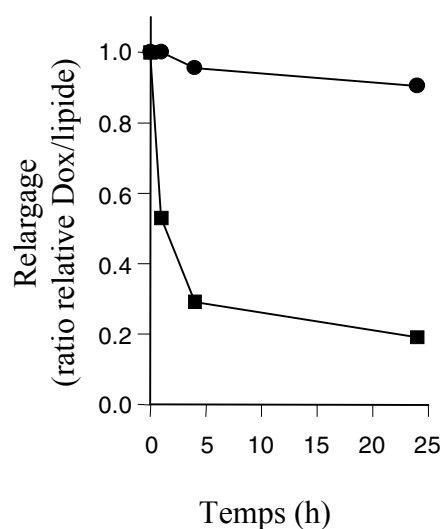
# Contrôle de la perméabilité de vésicules composées d'acide palmitique et de stérol

### 4.1 : Introduction

L'encapsulation de médicaments dans les liposomes présente plusieurs avantages dans le domaine d'industrie pharmaceutique. Les médicaments sous forme libre injectés dans le sang se distribuent généralement dans le corps, ce qui expose les tissus sains à une toxicité significative. L'encapsulation de médicaments dans les liposomes peut réduire le volume de distribution et diminuer les effets toxiques sur les tissus sains. De plus, les médicaments encapsulés présentent généralement, comparativement aux médicaments libres, une circulation de longue durée dans l'hôte, ce qui augmente leur accumulation aux sites infectés (ex : cellules cancérigènes)<sup>77-79</sup>. Les liposomes offrent aussi une protection aux ingrédients pharmaceutiques actifs contre des agents de dégradation qui sont présents dans le milieu d'action. Le succès de cette méthode est directement lié à la balance de deux facteurs : la stabilité des liposomes encapsulant le médicament lors de la circulation dans l'hôte et l'habileté de rendre le médicament biodisponible aux sites pathologiques. La composition lipidique des vésicules et la nature du médicament sont les éléments principaux qui déterminent l'association stable du médicament avec les liposomes.

L'optimisation du taux de relargage des médicaments est cruciale pour atteindre un maximum d'efficacité. Si le médicament se libère trop rapidement des liposomes, il n'a pas le temps d'atteindre la région infectée, ce qui ne donne aucun bénéfice thérapeutique comparativement au médicament libre. Si le médicament se libère trop lentement des liposomes, la quantité libérée à la région infectée pourrait ne pas atteindre les concentrations thérapeutiques<sup>79</sup>.

Un facteur qui affecte la perméabilité est l'ordre de la membrane. Généralement, plus la membrane est ordonnée et compacte, moins elle est perméable<sup>80</sup>. Par exemple, les chaînes saturées de la 1,2-distéaroylphosphatidylcholine (DSPC) conduisent à un coeur hydrophobe plus compact que les chaînes insaturées de la phosphatidylcholine d'œuf (EPC). Ainsi, la libération de la doxorubicine (Dox), un médicament contre le cancer du sein et des ovaires, est plus rapide à partir de liposomes EPC/Chol (55/45) que de liposomes DSPC/Chol (55/45)<sup>79</sup>. La **figure 4.1** montre que la moitié de la Dox est libérée après 1 h avec le mélange EPC/Chol et presque aucune libération n'est observée après 24 h avec le mélange DSPC/Chol.



**Figure 4.1.** : Cinétique de relargage passif de Dox des vésicules unilamellaires de EPC/Chol (55/45) et de DSPC/Chol (55/45) à 25 °C<sup>79</sup>.

Le relargage actif est basé sur un stimulus qui déstabilise les vésicules. Le stimulus peut être un changement environnemental. Par exemple, le pH de l'espace interstitiel de plusieurs tumeurs est plus bas que celui de cellules saines; des liposomes sensibles au pH permettent alors la libération du médicament à la tumeur<sup>79</sup>. Un stimulus externe peut être le changement local de la température. Les stimuli les plus communément utilisés sont thermiques, enzymatiques, le pH et photochimiques<sup>81-85</sup>.



L'imperméabilité des liposomes PA/Chol est très grande. En développant plusieurs liposomes majoritairement composés de PA et d'un stérol avec différentes perméabilités, il serait possible de développer des nouvelles formulations liposomales de médicaments. Dans le présent chapitre, certaines approches ont été examinées pour atteindre ce but.

#### 4.1.1 : Les approches

Comme il vient d'être mentionné, la présence de liaisons doubles dans les chaînes alkyles diminue la densité d'empilement des phospholipides dans les membranes lipidiques, ce qui augmente leur perméabilité<sup>86-87</sup>. Par exemple, une bicouche faite de DPPC, un lipide aux chaînes saturées, possède un coefficient de perméabilité de  $(1.09 \pm 0.2) \times 10^{-11}$  cm/s pour la calcéine à 25 °C, tandis qu'il est de  $(2.03 \pm 0.6) \times 10^{-10}$  cm/s pour une bicouche faite à partir de la 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DOPC), qui a une double liaison sur chacune de ses chaînes alkyles<sup>86</sup>. Alors, la première approche utilisée pour augmenter la perméabilité des vésicules sans phospholipides a été d'introduire une insaturation dans la chaîne de l'acide gras en remplaçant complètement le PA (saturé) par l'OA (une liaison double cis entre C9 et C10). Le mélange OA/Chol (30/70) a été étudié à pH 8.4.

En général, la littérature montre que les membranes à base de phospholipides ont une perméabilité plus grande que celles composées de PA/Chol<sup>1, 88-89</sup>. Les liposomes POPC et POPC/Chol (40/60) libèrent respectivement 90 % et 65 % de <sup>14</sup>C-glucose sur une période de 10 jours à pH 7.4, tandis que seulement 12 % du <sup>14</sup>C-glucose encapsulé dans des liposomes PA/Chol sont libérés après 30 jours<sup>1</sup>. La dissipation totale d'un gradient de pH (pH interne de 6 et pH externe de 8) de liposomes PA/Chol/SChol (30/28/42) est 100 fois plus longue que celle de liposomes POPC/Chol (40/60), ce qui montre que les liposomes POPC/Chol sont plus perméables<sup>89</sup>. Donc, la deuxième approche a été d'introduire la POPC dans le mélange de PA et de Chol (30/70). La composition molaire PA/POPC/Chol utilisée était 15/27.5/57.5, à pH 8.4. Les mélanges de POPC/Chol (40/60) et de POPC ont aussi été étudiés à pH 8.4 à des fins de comparaison.

Le SC est chargé négativement avec un groupement carboxylate, contrairement au Chol qui est neutre. Il n'a pas de chaîne alkyle en position 17, ce qui le distingue également du Chol. La répulsion électrostatique entre les PA déprotonés et le SC devrait mener à une plus grande aire interfaciale occupée par les molécules. Ce phénomène et l'absence de chaîne en position 17 pourraient mener à une diminution de la densité d'empilement des lipides et entraîner une plus grande perméabilité de la membrane. La littérature montre la possibilité de faire des bicouches phospholipides/SC et on rapporte une augmentation de la perméabilité des vésicules à base de phospholipides en présence de SC<sup>90-91</sup>. Ainsi, la troisième approche utilisée pour augmenter la perméabilité des liposomes PA/Chol a été de substituer un certain pourcentage de Chol par du SC dans le mélange PA/Chol (30/70). La composition molaire PA/SC/Chol utilisée dans le mélange lipidique était 30/35/35, à pH 8.4.

La littérature suggère que le SChol est un autre candidat possible pour le contrôle de la perméabilité des liposomes<sup>59, 92-94</sup>. En premier lieu, il a été démontré qu'il est possible de former des vésicules à base de phospholipides et de SChol. Cependant, l'ordre orientationnel des chaînes alkyles des lipides en phase lamellaire  $l_0$  est moins important dans le cas des membranes incluant du SChol que du Chol<sup>92-94</sup>. Ce comportement a aussi été observé dans les membranes PA/stérol<sup>59</sup>. Le SChol occupe une plus grande aire interfaciale, ce qui diminuerait l'ordre orientationnel des chaînes alkyles des lipides en phase lamellaire  $l_0$ <sup>59</sup>. Comme dans le cas de SC, le SChol est chargé négativement et la répulsion électrostatique interlipide peut contribuer à cette augmentation d'aire. De plus, il y a augmentation de la répulsion stérique à cause du groupement sulfate, plus volumineux que l'hydroxyle du Chol. En deuxième lieu, il a été démontré que la stabilité des bicouches PA/Chol et PA/SChol est sensible au pH<sup>59</sup>. D'abord, lorsque le mélange PA/Chol (30/70) est à un pH < 7.4, le groupement carboxylique de PA est protonné donc neutre; la répulsion électrostatique inter-PA est minimisée, ce qui mène à une séparation de phase. La formation de petits domaines de phase solide de PA et de Chol réduit la stabilité de la membrane à cause des jonctions entre ces domaines solides. Lorsque le mélange PA/Chol (30/70) est à un pH  $\geq$  7.4, une grande proportion de PA est déprotoné, ce qui crée une répulsion électrostatique inter-PA et empêche la séparation de phase de se produire. La bicouche  $l_0$  est alors très stable. Le cas inverse est observé pour les bicouches sans phospholipides avec SChol. Lorsque le mélange PA/SChol (30/70) est à un pH > 7, il y a une répulsion électrostatique entre PA déprotonné et SChol, aussi chargé négativement, ce qui mène à une séparation de phase qui déstabilise les

liposomes. Lorsque le mélange PA/SChol (30/70) est à un  $\text{pH} \leq 7$ , la protonation du groupement carboxylique de PA le rend neutre. La répulsion électrostatique inter-SChol chargé négativement empêche la séparation de phase de se produire et mène à la formation de la phase lamellaire  $l_0$  stable. En bref, PA/Chol et PA/SChol ont des comportements opposés face au changement de pH. Ainsi, la quatrième approche utilisée pour augmenter la perméabilité a été la substitution d'un certain pourcentage de Chol par SChol dans le mélange PA/Chol (30/70). Contrairement au relargage passif des approches précédentes, un relargage induit par le pH (une variation de pH 5.5 à 7.4) module la perméabilité. Pour assurer la stabilité initiale des liposomes, ils sont préparés à pH 5.5. Et puis, on mesure la perméabilité à pH 7.4. Ainsi, une partie de la libération est stimulée par la variation de pH puis se poursuit de manière passive. D'abord, on a étudié le cas extrême du mélange PA/SChol (30/70) qui forme une phase lamellaire  $l_0$  stable à pH 5.5 mais pour lequel il y a coexistence de phases solide et  $l_0$  à pH 7.4, menant à des bicouches instables. Deux autres proportions molaires du mélange PA/SChol/Chol ont été étudiées: 30/35/35 et 30/57/13.

## **4.2 : Résultats et discussion**

### **4.2.1 : Relargage passif**

En premier lieu, nous avons étudié le mélange OA/Chol. On a utilisé le protocole identique à celui rapporté pour faire des liposomes avec le mélange PA/Chol<sup>1</sup>. Nous avons établi qu'il est possible de faire des vésicules avec le mélange OA/Chol (30/70), ce qui n'avait jamais été observé auparavant. Le diamètre moyen des vésicules OA/Chol (30/70), à pH 8.4 était de  $122 \pm 8$  nm ( $n = 2$ ) avec une PDI de 0.071. La présence de l'insaturation dans OA mène à un point de fusion de  $13.4$  °C,<sup>95</sup> ce qui est beaucoup plus bas que celui de PA qui est de  $62.9$  °C<sup>96</sup>. En principe, l'OA, possédant une plus grande fluidité que le PA, devrait avoir plus de difficulté à faire des bicouches avec le Chol qui est une molécule plus rigide. Cependant, cet effet n'empêche pas la formation de bicouches  $l_0$  avec Chol.

Il a été possible d'encapsuler de la calcéine dans ces liposomes parce qu'on a observé un coefficient d'autoextinction de 95 %, une valeur typique de la calcéine encapsulée à haute concentration. Les résultats montrent que les liposomes OA/Chol (30/70) préparés à pH 8.4 libèrent 5 % de calcéine sur une période de 9 jours à 37 °C. En comparant ces résultats avec celui de PA/Chol (30/70)<sup>1</sup>, on voit qu'il n'y a pas d'augmentation de relargage de calcéine sur une période de 9 jours. L'augmentation considérable de perméabilité causée par l'insaturation lorsqu'on compare DPPC et DOPC<sup>2</sup> ne semble pas exister pour les stérosomes PA/Chol et OA/Chol; ce phénomène peut être associé au grand pourcentage de Chol dans les bicouches. Comme vu dans l'introduction (**Section 1.5.1**), la présence de Chol dans les bicouches phospholipidiques et non phospholipidiques les rend plus épaisses, plus rigides et donc, moins perméables. Pour de très grandes quantités de Chol, ce phénomène peut dominer l'effet de l'insaturation.

En deuxième lieu, la perméabilité des vésicules PA/POPC/Chol (15/27.5/57.5) à pH 8.4, a été mesurée à 37 °C. Ces liposomes, encapsulant la calcéine avec un coefficient d'autoextinction de 95 %, avaient un diamètre moyen de  $119.2 \pm 0.2$  nm ( $n = 2$ ) avec une PDI de 0.045. Les résultats de perméabilité montrent que ces liposomes libèrent très peu de calcéine, soit 1 % sur une période d'environ une semaine. Il n'y a pas d'augmentation de libération de calcéine par rapport aux liposomes PA/Chol (30/70)<sup>1</sup>. Donc, la présence de 27.5 % de POPC n'a pas d'effet significatif sur la libération de calcéine des liposomes formés principalement de PA et de Chol.

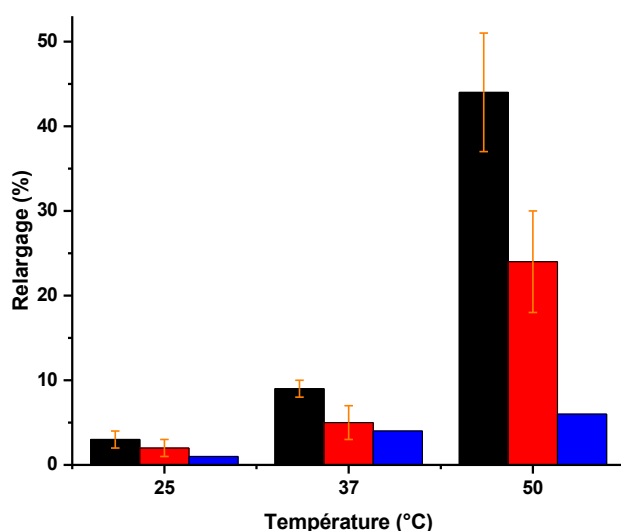
Ce résultat nous a mené à nous questionner sur la perméabilité à la calcéine des membranes faites de POPC/Chol et de POPC en absence de PA. Nous avons mesuré la perméabilité de ces systèmes. Les diamètres moyens des vésicules POPC/Chol (40/60) et de POPC à pH 8.4, étaient respectivement  $115 \pm 5$  nm ( $n = 3$ ) et  $93 \pm 9$  nm ( $n = 3$ ) avec une PDI de 0.057 et de 0.142 respectivement. Le coefficient d'autoextinction obtenu pour la calcéine dans ces deux liposomes était de 92 %. Les résultats de perméabilité montrent que les liposomes POPC/Chol (40/60) libèrent  $5 \pm 3$  % de calcéine ( $n = 3$ ) sur une période de 10 jours à 37 °C. Les liposomes POPC libèrent 10 % de calcéine sur une période de 9 jours à 37 °C. La perméabilité n'est donc que légèrement plus grande pour les liposomes POPC que pour ceux formés de PA/Chol. Cette perméabilité est réduite en présence de Chol. Contrairement au <sup>14</sup>C-glucose<sup>1</sup>, les

bicouches POPC/Chol (40/60) et POPC ne sont pas beaucoup plus perméables à la calcéine que celles de PA/Chol.

De manière assez surprenante, la perméabilité des bicouches de PC pour la calcéine n'est pas clairement établie dans la littérature. En faisant des recherches bibliographiques, nous trouvons des résultats contradictoires en ce que concerne la perméabilité des membranes à la base de PC<sup>1, 86-87, 97-98</sup>. Certaines études montrent une libération significative de calcéine des bicouches de PC et PC/Chol. Par exemple, une étude montre que les liposomes POPC/Chol (40/60) libèrent 70 % de calcéine sur une période d'environ 10 jours à 25 °C, à pH 7.4<sup>1</sup>. Une autre étude montre que les liposomes EPC/Chol (66/33) libèrent 86 % de calcéine après seulement une journée, à 37 °C, à pH 7.4<sup>97</sup>. Il a aussi été montré que les liposomes DPPC libèrent la totalité de la calcéine encapsulée après une heure à pH 7.0, à 45 °C<sup>98</sup>. Cependant, à pH 7.4 à 25 °C, il est rapporté que les vésicules POPC libèrent moins de 5 % de calcéine après une journée<sup>86</sup> et 10 % de calcéine après 15 heures<sup>87</sup>. De manière similaire, il est rapporté que les vésicules DPPC libèrent seulement 3 % de calcéine après une heure à pH 7.4, à 50 °C<sup>87</sup>. Les causes de ces divergences pour la perméabilité à la calcéine des liposomes à base de PC sont pour le moment inconnues. Dans nos conditions, la libération de calcéine des liposomes POPC et POPC/Chol semble très limitée et, en conséquence, l'introduction de POPC dans nos liposomes PA/Chol n'est pas une approche menant à une modulation intéressante de la perméabilité.

Nous avons déterminé l'effet de la température sur le relargage de la calcéine pour les bicouches POPC, POPC/Chol (40/60) et OA/Chol (30/70). La **figure 4.2** montre la libération de la calcéine encapsulée dans les liposomes POPC, POPC/Chol (40/60) et OA/Chol (30/70) pour une durée de 7 jours à 25, 37 et 50 °C. Après une semaine, le pourcentage de calcéine libérée des vésicules OA/Chol (30/70) à 25 °C, 37 °C et 50 °C est respectivement 1 %, 4 % et 6 %. Le pourcentage de calcéine libérée des vésicules POPC/Chol (40/60) à 25 °C, 37 °C et 50 °C est respectivement  $2 \pm 1$  %,  $5 \pm 2$  %,  $24 \pm 6$  % . Le pourcentage de calcéine libérée des vésicules POPC à 25 °C, 37 °C et 50 °C est respectivement  $2 \pm 2$  %,  $7 \pm 2$  %,  $37 \pm 16$  %. Il y a une augmentation considérable de la perméabilité des bicouches POPC à la calcéine avec l'augmentation de la température, en accord avec la littérature<sup>86-87, 98-99</sup>. L'effet est moindre pour les bicouches POPC/Chol et encore moins pour celles de OA/Chol. Ce résultat suggère que le coefficient d'expansion thermique devrait être plus grand pour les systèmes de POPC que le

système OA/Chol (30/70) puisque la perméabilité est liée au volume libre existant dans la bicouche. Le coefficient d'expansion thermique pour le système PA/Chol (25/75) est plus bas que celui de systèmes de phospholipides dans la phase lamellaire  $l_0$  à cause de la grande quantité de Chol<sup>2, 100-102</sup>. Le Chol, qui est la partie majeure de la bicouche PA/Chol a une expansion thermique très limitée et est incapable d'augmenter son aire interfaciale sans exposer sa partie hydrophobe de la bicouche à l'environnement aqueux<sup>2</sup>. Un phénomène similaire peut être proposé pour les bicouches OA/Chol.



**Figure 4.2.** : Libération de calcéine des vésicules unilamellaires de POPC (■), de POPC/Chol (40/60) (●) et OA/Chol (30/70) (▲) à pH 8.4 pour 25, 37 et 50 °C après une semaine.

En troisième lieu, nous avons examiné si on pouvait diminuer la densité d'empilement des lipides et entraîner une plus grande perméabilité en remplaçant une portion de Chol dans le mélange lipidique par SC, chargé négativement et n'ayant pas de chaîne alkyle en position 17. Il a été possible de former des liposomes avec le mélange PA/SC/Chol (30/35/35) et d'y encapsuler de la calcéine. Le diamètre moyen de ces liposomes était de  $119 \pm 2$  nm ( $n = 1$ ) avec une PDI de 0.077. Le coefficient d'autoextinction de la calcéine était de 93 %. La perméabilité de ces

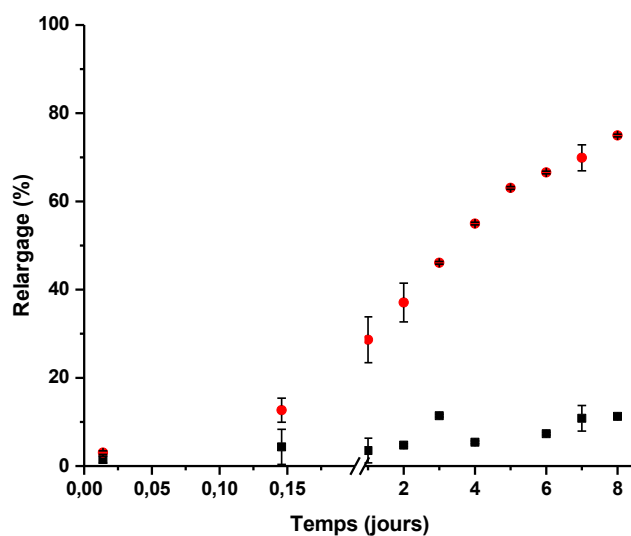
vésicules PA/SC/Chol a été mesurée à 37 °C, à pH 8.4. Les résultats de perméabilité montrent que ces liposomes libèrent 1 % de la calcéine encapsulée sur une période d'une semaine. On n'observe pas d'augmentation de libération de calcéine par rapport aux liposomes PA/Chol (30/70)<sup>1</sup>. Cette perméabilité très limitée pourrait s'expliquer par l'exclusion du SC de la bicouche qui pourrait faire, de manière plus ou moins indépendante, des micelles dans l'eau<sup>91</sup>. Ce phénomène pourrait être attribué à la nature plus hydrophile du SC comparé au Chol. L'insertion limitée du SC dans la membrane lipidique ne perturberait pas l'empilement des lipides dans la membrane de manière significative. Une autre suggestion serait que le SC s'insère dans la bicouche mais les répulsions électrostatiques entre les espèces chargées négativement n'induisent pas de perturbation dans l'empilement des lipides; elles sont réduites par la présence de Chol, une molécule neutre. Seules des expériences additionnelles pourraient permettre d'établir les causes exactes de l'absence d'effet de SC sur la perméabilité des vésicules PA/Chol (30/70).

#### 4.2.2 : Relargage induit par le pH

En quatrième lieu, nous avons examiné la possibilité de moduler la perméabilité des liposomes PA/Chol en substituant le Chol par le SChol. L'étude de la perméabilité a été menée en utilisant une sonde faiblement chargée négativement, la Sulf B, et une sonde fortement chargée négativement, la calcéine. Pour avoir un point de référence, on a d'abord étudié la perméabilité passive de la Sulf B des vésicules PA/SChol (30/70) à 25 °C, à pH 5.5. Le diamètre moyen des liposomes était de  $126 \pm 14$  nm ( $n = 3$ ) avec une PDI de 0.068. Le coefficient d'autoextinction de la Sulf B était 89 %. On observe  $11 \pm 3$  % de libération de Sulf B après une semaine (**Figure 4.3**). Ce résultat est très semblable au résultat obtenu pour la calcéine (8 %)<sup>59</sup>. À pH 5.5, la bicouche PA/SChol est très stable<sup>59</sup> et est donc imperméable autant à la calcéine qu'à la Sulf B.

La libération de Sulf B des vésicules PA/SChol (30/70) induite par un saut de pH de 5.5 à 7.4 a été étudiée. Le profil de libération (**Figure 4.3**) montre  $3.0 \pm 0.4$  % et  $37 \pm 4$  % de relargage de Sulf B après respectivement 20 minutes et 2 jours suivant l'augmentation de pH. Une semaine plus tard, on observe  $73 \pm 6$  % de libération de Sulf B. Il y a une énorme augmentation de relargage de Sulf B comparativement au mélange PA/Chol (30/70) qui libère 30 % de calcéine sur une période de 20 mois<sup>1</sup>. On amène les vésicules PA/SChol (30/70) d'une phase stable, à pH

5.5, (la phase lamellaire  $l_0$ ) à une phase instable, à pH 7.4 (formation de domaines), ce qui provoque l'augmentation de la perméabilité<sup>59</sup>. Nous voyons donc qu'il est possible de contrôler la libération de matériel encapsulé en fonction du temps, à pH 7.4.

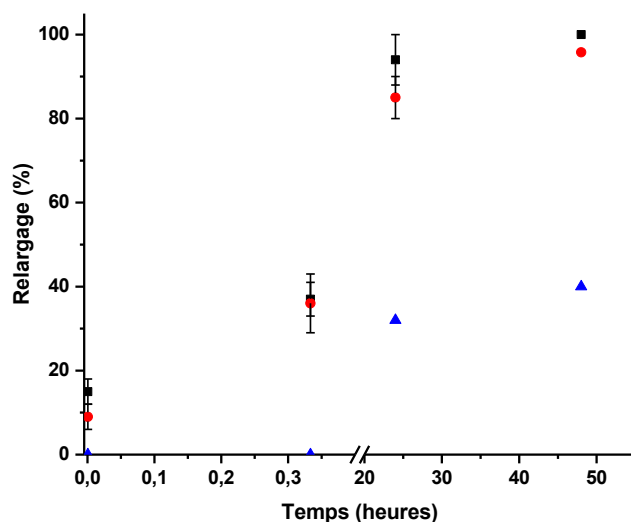


**Figure 4.3.** : Cinétique de relargage passif (pH = 5.5) (■) et de relargage induit par le saut de pH de 5.5 à 7.4 (●) de Sulf B des vésicules unilamellaires de PA/SChol (30/70) (n = 3) à 25 °C.

On a étudié la perméabilité à la calcéine, induite par le saut de pH de 5.5 à 7.4, des vésicules PA/SChol (30/70) à 25 et 37 °C. Il faut d'abord noter qu'à la température ambiante, l'extrusion de cette suspension était très difficile en présence de calcéine. Donc, l'extrusion a été menée à 70 °C. Le diamètre moyen des vésicules était de  $155 \pm 12$  nm (n = 3) avec une PDI de 0.058. Le coefficient d'autoextinction de la calcéine était 95 %. Les profils de libérations obtenus (**Figures 4.4**) montrent que les liposomes PA/SChol (30/70) à 37 °C, libèrent  $37 \pm 4$  % de calcéine après les 20 premières minutes et 100 % de calcéine après deux jours. Les profils de libération à 25 et à 37 °C sont très semblables.



En comparant les résultats obtenus après deux jours, le pourcentage de relargage de calcéine est 2.6 fois plus grand que celui de la Sulf B. Il est possible que la bicouche PA/SChol soit tout simplement plus perméable à la calcéine qu'à la Sulf B. Cependant, la calcéine est plus fortement chargée négativement (une charge formelle de -4) que la Sulf B (une charge formelle de -1). La bicouche PA/SChol est aussi fortement chargée négativement à pH 7.4 (PA déprotoné et SChol chargé négativement). Ainsi, la grande répulsion électrostatique entre la calcéine et la membrane PA/SChol devrait appauvrir la proximité de la membrane en sonde et limiter la perméabilité<sup>79</sup>. Cette perméabilité accrue des liposomes PA/SChol pour la calcéine comparée à celle pour la Sulf B ne trouve pas d'explications en ce moment. Ce comportement, couplé avec la difficulté d'extrusion de ce système nous a amené à examiner l'existence d'interactions entre la calcéine et les membranes lipidiques chargées; ceci fait l'objet du **chapitre 5**.



**Figure 4.4.** : Cinétique de relargage induit par le saut de pH de 5.5 à 7.4 de calcéine des vésicules PA/SChol (30/70) (n = 3, sauf pour 48 h où n = 1), à 25 (■) et 37 °C (●) et PA/SChol/Chol (30/35/35) (n= 1) à 25 °C (▲).

La perméabilité à la Sulf B des vésicules PA/SChol/Chol (30/57/13) a été mesurée à 25 °C; ces liposomes possèdent un contenu intermédiaire en SChol. Ces liposomes, dont le diamètre moyen était de  $116 \pm 12$  nm ( $n = 3$ ) avec une PDI de 0.097, encapsulait la Sulf B avec un coefficient d'autoextinction de 95 %. La libération passive à pH 5.5 mène à  $11 \pm 1$  % de relargage pour une période d'une semaine. Le relargage induit par l'augmentation de pH (saut de pH 5.5 à 7.4) entraîne une libération de  $16 \pm 3$  % après une semaine. À pH 5.5, le profil de libération de la Sulf B des liposomes PA/SChol/Chol (30/57/13) est similaire au celui des liposomes PA/SChol (30/70). Cependant, la variation de pH (saut de 5.5 à 7.4) ne provoque pas l'augmentation de libération pour les liposomes PA/SChol/Chol (30/57/13). La littérature indique que le mélange PA/SChol/Chol (30/57/13) est en phase lamellaire lo autant à pH 5.5 qu'à pH 7.4<sup>59</sup>; ce phénomène expliquerait l'absence de variation de perméabilité de ces membranes. Il n'y a pas de formation de domaines en phase solide et la diminution d'ordre orientationnel des chaînes alkyles des lipides dans la bicouche à cause de la présence de SChol n'est pas suffisante pour augmenter la perméabilité à la Sulf B<sup>92-94</sup>. Bref, les vésicules PA/SChol/Chol (30/57/13) ne relarguent pas la Sulf B de manière intermédiaire. Pour moduler la perméabilité induite par la variation de pH, il faudrait varier le pourcentage de SChol entre 95 et 100 (mol) %. Le diagramme pH-composition du mélange PA/SChol/Chol indique que ces pourcentages de SChol conduisent, à pH 7.4, à la coexistence de phases solide et lo en différentes proportions, ce qui pourrait moduler la perméabilité membranaire<sup>59</sup>.

La perméabilité des vésicules PA/SChol/Chol (30/35/35) à la calcéine, induit par une variation de pH de 5.5 à 7.4, a été mesurée à 25 °C. L'étape de l'extrusion était difficile à la température ambiante et a donc été faite à 70 °C. Le diamètre moyen des liposomes obtenus était de  $149 \pm 12$  nm ( $n = 1$ ) avec une PDI de 0.064 et ils encapsulaient la calcéine avec un coefficient d'autoextinction de 94 %. Le profil de libération montre 0 % et 40 % de relargage de calcéine après respectivement 20 minutes et 2 jours (**Figure 4.4**). Après 2 jours, le relargage de la calcéine des vésicules PA/SChol/Chol (30/35/35) est 2.4 fois moindre que celui pour des vésicules PA/SChol (30/70) et énormément plus que celui de liposomes PA/Chol (30/70)<sup>1</sup>. Cet effet est surprenant puisque la littérature indique que le mélange PA/SChol/Chol (30/35/35) est en phase lamellaire lo autant à pH 5.5 qu'à 7.4<sup>59</sup>. Nous avons d'ailleurs montré que les liposomes PA/SChol/Chol (30/57/13) demeurent passablement imperméables à la Sulf B à pH 7.4. Alors,

l'hypothèse que la présence de calcéine vienne perturber davantage le système lipidique a besoin d'être examinée.

### **4.3 : Conclusion**

Notre deuxième objectif, qui consistait à moduler la perméabilité des vésicules PA/stérol, a été partiellement atteint. L'introduction d'une insaturation dans la chaîne alkyle en substituant PA par OA dans le mélange acide gras/Chol (30/70) n'a pas mené à une plus grande perméabilité de la membrane. Notre hypothèse qui proposait que la présence de POPC dans le mélange PA/Chol allait conduire à une membrane plus perméable n'a pas été confirmée. La perméabilité à la calcéine des membranes à base de PC n'est pas bien établie dans la littérature<sup>1, 86-87, 97-98</sup>. La substitution de 50 % de Chol par du SC n'a pas donné lieu, elle non plus, à la modulation de perméabilité désirée.

Cependant, il a été possible d'avoir une membrane qui a une très grande perméabilité en substituant complètement le Chol par SChol et en induisant la libération par une variation de pH. Pour être capable de trouver différentes formulations lipidiques avec des perméabilités variées, le diagramme pH-composition suggère la préparation du mélange PA/SChol/Chol en faisant varier les compositions molaires entre 30/63/7 à 30/70/0<sup>59</sup>.

Les résultats de perméabilité avec la calcéine nous amène à considérer que la calcéine pourrait interagir avec des bicouches composées de lipides chargés, ce qui pourrait venir déstabiliser la membrane. Pour étudier cette hypothèse, nous avons examiné l'effet des ions, dont la calcéine, sur les membranes chargées; cette étude fait l'objet du prochain chapitre.

# Chapitre 5

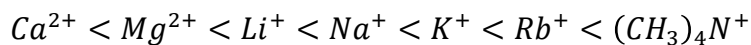
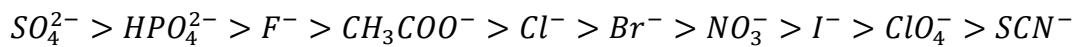
## Effet des anions, dont la calcéine, sur des bicouches chargées positivement composées de stéarylamine et cholestérol

### 5.1 : Introduction

Les effets de certains ions sont universels en biologie, en biochimie, en chimie et en génie chimique. Ces effets sont observables pour une large gamme de phénomènes : la CCA, le point de trouble des surfactants non-ioniques, le transport à travers une membrane, les forces intermoléculaires, la stabilité des colloïdes, etc<sup>103-105</sup>.

Les séries d'Hofmeister ont d'abord été introduites pour décrire l'habileté des ions à affecter la solubilité des protéines. Franz Hofmeister et ses collègues étaient les premiers à étudier ces effets systématiquement. Les séries d'Hofmeister, une pour les anions et une pour les cations, représentent, en ordre croissant, l'habileté des ions à précipiter des protéines d'œuf de poule (**Figure 5.1**)<sup>106-108</sup>. L'effet d'Hofmeister est généralement plus prononcé chez les anions que les cations<sup>104</sup>.

#### Kosmotropes



#### Chaotropes

**Figure 5.1.** : Deux séries d'Hofmeister représentant l'ordre des ions en terme de leur habileté à affecter la solubilité des protéines d'œuf de poule<sup>106-108</sup>.

### 5.1.1 : Évolution de la théorie

Jusqu'à ce jour, les théories n'expliquent pas parfaitement les effets d'Hofmeister sur les macromolécules (peptides, protéines, et polymères). Initialement, il a été supposé que l'organisation des molécules d'eau autour des ions s'étendait au-delà de la première couche d'hydratation. Ainsi, les ions affectaient le système aqueux en détruisant ou en construisant le réseau des molécules d'eau<sup>104, 109</sup>; ils ont alors été classés selon deux types: kosmotropes et chaotropes. Les ions kosmotropes ont été proposés pour contribuer à la construction du réseau en renforçant les liaisons H entre les molécules d'eau, encourageant ainsi l'agrégation des macromolécules. Les ions chaotropes conduisaient à la destruction des liaisons H du réseau des molécules d'eau; ils défavorisaient l'agrégation des macromolécules. Cependant, des études plus récentes contestent cette explication<sup>110-114</sup>. Par exemple, Bakker et ses collègues ont étudié la couche d'hydratation des différents anions à l'aide de la spectroscopie femtoseconde<sup>110-113</sup>. Ils ont montré qu'il n'y a pas de changement de liaisons H dans le réseau d'eau en présence d'ions. Pielak et ses collègues ont analysé l'effet de divers sels stabilisants et dénaturants sur la structure de l'eau par calorimétrie à perturbation de pression. Ils ont conclu que les effets de ces espèces sur la structure d'eau ne suit pas les séries d'Hofmeister<sup>114</sup>.

Il est maintenant proposé que les séries d'Hofmeister peuvent s'expliquer par le résultat direct de l'interaction des ions avec les macromolécules et leurs couches d'hydratation immédiates<sup>104</sup>. Les séries seraient reliées à l'entropie d'hydratation des anions, l'augmentation de la tension de surface causée par les anions et leur habileté à se lier aux macromolécules. Les termes kosmotrope et chaotrope sont toujours utilisés, cependant leur définition est modifiée. La division se base plutôt sur le degré d'hydratation de l'ion et la polarisabilité. Les ions kosmotropes sont fortement hydratés et moins polarisables; leur première couche d'hydratation est fortement retenue<sup>115</sup>. Les chaotropes sont faiblement hydratés et plus polarisables; la première couche d'hydratation est faiblement retenue. Leurs effets sur certaines propriétés sont résumés à la **figure 5.2**.

<b><u>Kosmotropes</u></b>	<b><u>Chaotropes</u></b>
Tension de surface ↑	Tension de surface ↓
Difficulté à faire une cavité*	Facilité à faire une cavité*
Solubilité des hydrocarbures ↓	Solubilité des hydrocarbures ↑
Stabilité des protéines ↑	Stabilité des protéines ↓
Agrégation des macromolécules ↑	Agrégation des macromolécules ↓

\*cavité : accumulation de soluté à l'interface

**Figure 5.2.** : Effet de kosmotropes et chaotropes sur certaines propriétés<sup>116-117</sup>.

### 5.1.2 : Agrégation des vésicules

Plusieurs études font l'analogie entre les macromolécules et les vésicules en suspension en milieu aqueux en ce qui concerne le phénomène d'agrégation<sup>118-119</sup>. Les deux entités peuvent être vues comme des particules, globalement chargées ou pas, possédant des charges à leur surface; les forces modulant l'agrégation seraient semblables.

Selon la théorie classique de DLVO (Derjaguin, Landau, Verway et Overbeek) sur l'agrégation, l'interaction entre les vésicules en suspension est l'équilibre entre les forces attractives de van der Waals et les forces répulsives de doubles couches électroniques<sup>120</sup>. Si la répulsion électrostatique est assez grande, les vésicules se repoussent et restent stables en suspension; l'agrégation est défavorisée. L'agrégation est observée si les forces d'attraction entre les vésicules dominent sur les forces de répulsions électrostatiques.

La modulation de la tension interfaciale bicouche/phase aqueuse joue aussi un rôle important sur l'agrégation des vésicules. Alors, les facteurs qui modifient la tension interfaciale, comme l'hydratation de bicouches, influencent l'agrégation. À l'interface bicouche/phase aqueuse, les têtes hydrophiles des lipides se lient avec les molécules d'eau à l'intérieur de la couche d'hydratation. Ceci conduit, par exemple, à une diffusion translationnelle de l'eau à ~10 Å de la surface de vésicules unilamellaires de POPC (~ 3 couches d'hydratation autour de la bicouche) 5 fois plus lente qu'au sein de la solution<sup>119</sup>. Le ralentissement des mouvements translationnels des molécules d'eau comparativement au sein de la solution est causé par leur interaction avec les têtes polaires des lipides POPC. Une diminution d'interaction des têtes

polaires avec les molécules d'eau à l'interface bicouche/phase aqueuse (bicouche déshydratée) augmente la tension interfaciale. Dans ce cas, les interactions bicouche-bicouche sont favorisées, ce qui mène à l'agrégation<sup>121</sup>.

### 5.1.3 : Effet de sels sur l'agrégation

La présence de sels a un impact sur le phénomène d'agrégation des vésicules. Une surface possédant des charges positives, comme dans le cas des vésicules SA/Chol, attire les anions qui écrantent les forces électrostatiques à la surface, diminuant la répulsion électrostatique entre les vésicules et encourageant l'interaction bicouche-bicouche<sup>120, 122-123</sup>. Notre sujet d'intérêt est les anions mais un raisonnement semblable peut se faire entre une surface possédant des sites chargés négativement et les cations.

La grandeur de l'effet d'un anion sur l'agrégation dépend de sa nature. Selon la loi de Schulze-Hardy, la valence de l'anion est le paramètre le plus important<sup>120, 122, 124-126</sup>. Pour une surface possédant des charges positives, plus la valence de l'anion est grande, plus les interactions électrostatiques sont fortes avec les sites chargés; la répulsion électrostatique est plus écrantée ce qui favorise l'agrégation.

Outre la valence, l'impact des ions sur l'agrégation dépend, entre autres, de son degré d'hydratation, de sa polarisabilité et de sa concentration. Ces effets sont complexes. Par exemple, l'agrégation des macromolécules peut suivre la série d'Hofmeister directe ou inverse dépendamment de la concentration de sels<sup>110-114</sup>. Aux basses concentrations d'anions, l'interaction électrostatique est liée à la grosseur et l'hydratation des anions et la grandeur de l'effet suit les séries inverses d'Hofmeister. Les anions chaotropes, gros et faiblement hydratés, sont plus aptes à se débarrasser de leur couche d'hydratation et à se lier aux sites chargés positivement de la surface. Cependant, ce comportement a un effet saturant car au-delà d'une certaine concentration, la majorité des sites chargés sont neutralisés. Après la neutralisation des charges positives de la surface, à hautes concentrations de sels, l'agrégation suit la série directe d'Hofmeister<sup>104</sup>; cet effet est alors dû principalement au changement dans la tension interfaciale bicouche/phase aqueuse en présence des anions. Les anions chaotropes (fortement polarisables) s'accumulent grandement à l'interface bicouche/phase aqueuse, diminuent la tension interfaciale et inhibent l'agrégation<sup>110-114</sup>. En présence des anions kosmotropes (fortement hydratés) en

solution, les têtes polaires des lipides sont déshydratés<sup>119</sup>, ce qui cause l'agrégation de bicouches. L'agrégation de lysozyme, une protéine chargée positivement, en présence des anions monovalents illustre bien l'effet de la concentration de sels<sup>110-114</sup>. Aux basses concentrations d'anions ( $\sim$  d'ordre  $10^1$  mM), la grandeur de l'effet suit les séries inverses d'Hofmeister. À hautes concentrations de sels ( $\cong$  d'ordre  $10^2$  mM), la grandeur de l'effet suit la série directe d'Hofmeister.

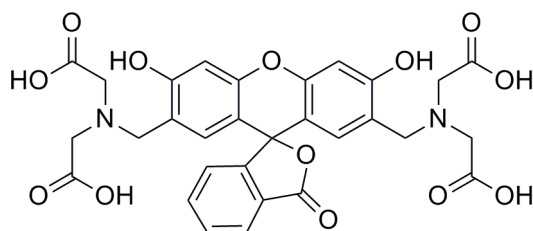
L'effet des anions sur l'auto-assemblage de phospholipides a aussi été discuté en termes de séries d'Hofmeister. Le comportement de phase de POPE, possédant un groupement ammonium comme SA, en dispersion aqueuse a été examiné en présence de plusieurs sels de sodium à haute concentration<sup>118</sup>. La température de transition ( $T_h$ ) de la phase lamellaire liquide-désordonnée à la phase hexagonale inversée ( $L_\alpha \rightarrow H_{II}$ ), a été mesurée. Lors de cette transition, deux bicouches doivent entrer en contact, un phénomène analogue à l'agrégation. La présence de sels composés d'anions kosmotropes (comme  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et  $\text{NaCl}$ ) a mené à une diminution substantielle de la  $T_h$  tandis que les sels composés d'anions chaotropes (comme  $\text{NaI}$  et  $\text{NaSCN}$ ) a mené à son augmentation. Un résultat similaire est observé pour DOPE et les mesures de la  $T_h$  suivent la série inverse d'Hofmeister :  $\text{SO}_4^{2-} < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{SCN}^-$ <sup>127</sup>. À exception de l'anion  $\text{SO}_4^{2-}$  pour lequel les interactions électrostatiques sont dominantes, tous les autres anions sont monovalents. Ainsi, plus l'anion monovalent est hydraté, plus les interactions bicouche-bicouche sont encouragées à une plus basse température. La phase hexagonale inversée est favorisée quand les têtes polaires des lipides sont déshydratées parce que les liaisons H entre les groupements phosphates et groupements éthanamines protonés sont favorisés<sup>127</sup>.

#### 5.1.4 : Effet des anions chaotropes volumineux

La calcéine est un anion volumineux qui, avec ses charges, est très soluble dans l'eau. La présence de cycles aromatiques, cependant, lui confère une certaine hydrophobicité (**Figure 5.3**). Les électrons pi des groupements aromatiques sont facilement polarisables. Les ions comme la calcéine ne peuvent pas être classifiés dans la série classique d'Hofmeister à cause de leur structure et comportement différents des ions classiques. Des études récentes ont proposé une catégorie à part pour ce genre d'ions : les chaotropes volumineux ou destructeurs de matière molle<sup>60, 128</sup>. Ce sont toutes des molécules volumineuses avec une certaine hydrophobicité. Cette

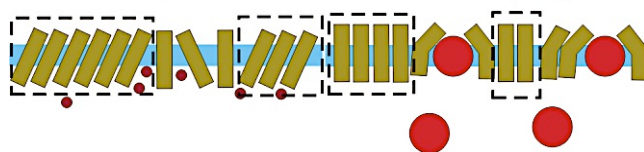


catégorie inclut : tétraphénylborate ( $\text{TPB}^-$ ), tétraphénylphosphonium, tétraphénylarsonium, tétrabutylammonium, dipicrylamine, ion salicylate et  $\text{PF}_6^-$ . Plusieurs chaotropes possèdent aussi des aromatiques substitués avec des groupements carboxylates, sulfonates et phénolates. Certains d'entre eux peuvent s'auto-assembler en solution mais à des concentrations beaucoup plus hautes que les surfactants. Divers études affirment que l'impact des chaotropes est plus grand que celui des ions kosmotropes et chaotropes classiques<sup>128</sup>.



**Figure 5.3.** : Structure de calcéine

Par exemple, l'effet de désordre de différents anions sur une monocouche de Langmuir de DPPC a été étudié à 12 °C<sup>60</sup>. En absence de sels, la monocouche est hautement ordonnée. Une étude utilisant les isothermes, la microscopie à l'angle de Brewster, la diffraction des rayons X à incidence rasante et la spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption confirme que le désordre dans une monocouche de DPPC en présence d'ions est le résultat de leur intercalation dans la monocouche, ce qui induit la phase fluide (**Figure 5.4**). La présence d'ions dans la monocouche cause son expansion et introduit du désordre dans les chaînes alkyles du lipide. Les anions chaotropes volumineux,  $\text{PF}_6^-$  et  $\text{TPB}^-$ , présentent un effet plus prononcé sur le désordre<sup>129-131</sup>.



**Figure 5.4.** : Schéma de la monocouche perturbée en présence des anions chaotropes et en présence des anions chaotropes volumineux<sup>60</sup>.

L'interaction de la calcéine avec des bicouches de PC a été étudiée par DSC<sup>132</sup>. Les résultats indiquent que la calcéine (10 mM) provoque, pour les bicouches DPPC, l'abolition de la pré-transition, une transition gel-gel existant une dizaine de degrés sous la  $T_m$ . Cette abolition a été attribuée à la proximité de la calcéine à l'interface de la bicouche. La spectroscopie Raman indique l'interaction de la calcéine avec la choline des PC. De plus, la présence de calcéine provoque une augmentation de l'aire moléculaire dans les monocouches de PC à l'interface air/eau. Ces résultats suggèrent que la calcéine a tendance à s'associer aux têtes polaires des amphiphiles monoalkylés.

Lors de l'utilisation de la calcéine comme sonde pour les mesures de perméabilité, il est supposé qu'il n'y a pas d'interaction entre cette sonde et les liposomes. Suite à des variations observées dans la perméabilité des vésicules à la calcéine et les problèmes constatés pendant les extrusions, nous avons examiné l'effet de divers anions, dont la calcéine, sur les bicouches chargées du mélange SA/Chol (50/50) et étudié si la magnitude de cet effet peut être rationalisée sur la base de la série d'Hofmeister.

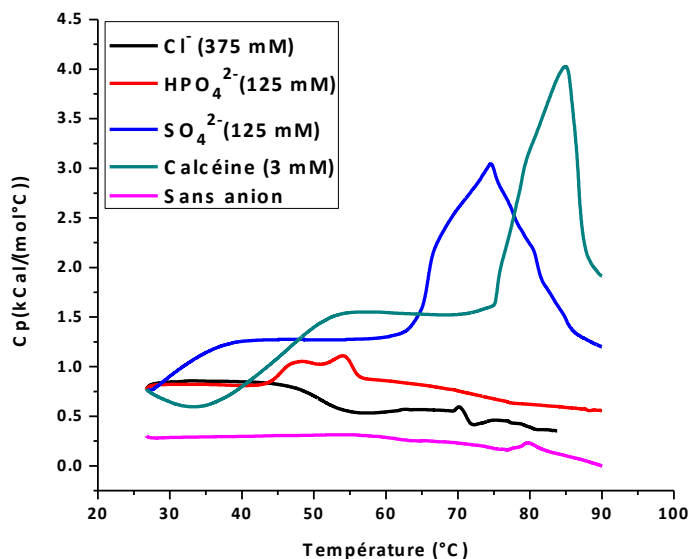
Nous avons étudié le thermogramme du mélange équimolaire SA/Chol hydraté dans le tampon TRIS (5 mM), à pH 7.4, en présence de différents ions, dont la calcéine. Les ions choisis pour cette étude sont l'ion chlorure  $\text{Cl}^-$  (375 mM), l'ion hydrogénophosphate  $\text{HPO}_4^{2-}$  (125 mM) et l'ion sulfate  $\text{SO}_4^{2-}$  (125 mM). Les concentrations d'ions ont été choisies afin d'avoir une force ionique équivalente pour toutes les solutions. Afin d'éviter une saturation des signaux DSC, la calcéine fait cependant exception; sa concentration (3 mM) était 40 fois inférieure à celle qui aurait mené à la même force ionique. Le contre-ion utilisé est le cation  $\text{Na}^+$ .

## 5.2 : Résultats et discussion

Les liposomes SA/Chol (50/50) préparés pour étudier le comportement thermique avaient un diamètre moyen, mesuré par DLS, de  $124 \pm 9$  nm ( $n = 3$ ) avec un PDI de 0.126. En premier, l'analyse thermique de vésicules SA/Chol (50/50) dans le tampon TRIS (5 mM), à pH 7.4, a été faite pour avoir un point de référence. Le thermogramme a été enregistré entre 25 et 90 °C (**Figure 5.4**). Il n'y a aucune transition de phase observée. Ce résultat concorde avec la littérature qui indique qu'il n'y pas a de transition observée pour le mélange équimolaire SA/Chol puisque la bicouche demeure en phase fluide sur tout ce domaine thermique<sup>5</sup>.

Le thermogramme de liposomes SA/Chol (50/50) hydratés dans le tampon TRIS (5 mM) en présence d'ion NaCl (375 mM) est présenté à la **figure 5.5**. Il n'y a pas de transition de phase significative observée, de manière similaire aux bicouches SA/Chol (50/50) hydratées dans le tampon TRIS (5 mM) sans autre ion<sup>4</sup>. L'ion Cl<sup>-</sup> n'a pas d'effet apparent sur le thermotropisme des stérosomes SA/Chol (50/50).

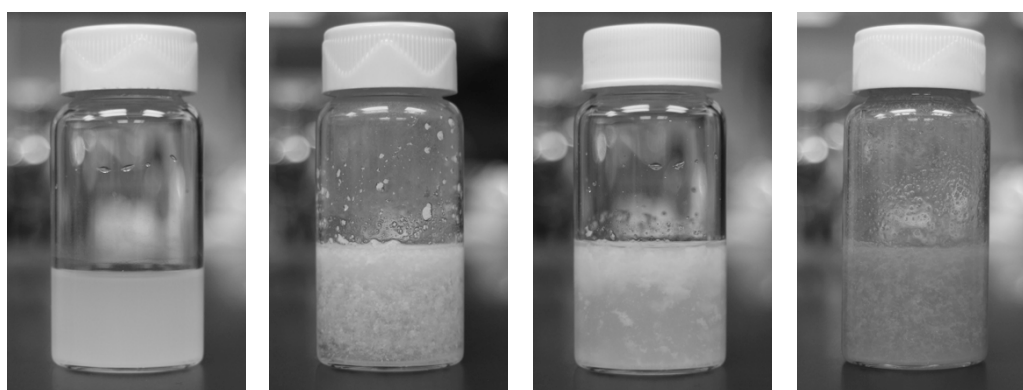
La présence de HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (125 mM) modifie l'aspect du mélange SA/Chol. La **figure 5.6; a, b** montre la dispersion de SA/Chol (50/50) avant et après l'ajout d'ions HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> à la température ambiante. On observe la formation d'agrégats macroscopiques instantanément après l'ajout des ions HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Le thermogramme de SA/Chol (50/50) en présence de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (125 mM) est présenté à la **figure 5.5**. Un signal endotherme complexe est observé autour de 55 °C. L'enthalpie de transition correspond à 8 kJ/mol de lipides (soit SA et Chol) (**Tableau 5.1**). Les agrégats observés pourraient être associés à la transition de phase à 55 °C, puisque, visuellement, l'échantillon passe d'un état solide/agrégé à un état mieux dispersé lors du chauffage de manière réversible.



**Figure 5.5.** : Thermogrammes du mélange SA/Chol (50/50) hydraté dans le tampon TRIS (5 mM) en présence de différents ions.

**Tableau 5.1.** : Enthalpie de transition associée au pic principal des thermogrammes du mélange SA/Chol (50/50) hydraté dans le tampon TRIS (5 mM) en présence de différents ions

Ion	Cl <sup>-</sup> (375 mM)	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (125 mM)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (125 mM)	Calcéine (3 mM)
Température de transition (°C)	-	55	75	85
Enthalpie de transition (kJ/mol de lipides)	-	8	90	67



(a)

(b)

(c)

(d)

**Figure 5.6.** : Les mélanges SA/Chol (50/50) hydratés dans le tampon TRIS (5 mM) : en absence d'autre sel (a), en présence de HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (125 mM) (b), de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (125 mM) (c) et de calcéine (3 mM) (d).

On a aussi étudié les vésicules SA/Chol en présence d'ions  $\text{SO}_4^{2-}$ . L'observation d'agrégats à la température ambiante dès l'ajout de la solution d'ions  $\text{SO}_4^{2-}$  était très similaire au comportement du mélange avec l'ion  $\text{HPO}_4^{2-}$  (**Figure 5.6; c**). Le thermogramme (**Figure 5.5**) de SA/Chol (50/50), pH = 7.4, en présence de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (125 mM) montre un pic à 75 °C. L'enthalpie de transition correspond à 90 kJ/mol (**Tableau 5.1**). Les agrégats semblent passer d'un état solide/agrégé à un état mieux dispersé à 75 °C, lors du chauffage de l'échantillon de manière réversible.

L'effet des ions sur la température et l'enthalpie de transition suit le même ordre que la série d'Hofmeister pour la précipitation de protéines d'œuf de poule :  $\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{Cl}^-$  (*pas de pic*)<sup>106-108</sup>. Les anions  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$  sont divalents. Donc, leurs interactions électrostatiques avec le groupement ammonium de SA sont plus fortes que l'anion monovalent  $\text{Cl}^-$ , ce qui encourage l'agrégation. Pour ces deux anions, l'impact sur l'agrégation des vésicules dépend de leur degré d'hydratation. L'anion  $\text{SO}_4^{2-}$  est plus fortement hydraté que  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Alors, il déshydrate plus les lipides des bicouches, ce qui augmente la tension interfaciale bicouche/phase aqueuse et favorise l'agrégation. Ce comportement est observé quand la concentration de sels est assez haute pour que tous les sites chargés soient essentiellement neutralisés, ce qui est le cas dans le cadre de nos travaux d'expérimentation.

L'effet de la calcéine sur les bicouches SA/Chol a aussi été examiné. L'observation d'agrégats était visible dès l'ajout de la calcéine (**Figure 5.6; d**). Le thermogramme de bicouches SA/Chol (50/50) hydratées dans le tampon TRIS (5 mM) en présence de la calcéine (3 mM) est présenté à la **figure 5.5**. La concentration de calcéine utilisée est 40 fois inférieure à celle qui conduirait à la même force ionique que les autres ions étudiés. Un pic a été observé autour de 85 °C et l'enthalpie de transition correspondante était de 67 kJ/mol (**Tableau 5.1**). La température de transition pour la calcéine est plus haute que celles obtenues avec tous les autres ions.

Les résultats d'une étude antérieure indiquent une interaction PC-calcéine<sup>132</sup>; nous proposons que la calcéine s'associe avec le groupement ammonium de SA à cause des interactions électrostatiques. Bien qu'une certaine association soit mise de l'avant, la stabilité des bicouches de PC ne semble pas être perturbée de manière significative par la calcéine<sup>132-133</sup>. Cependant, dans le cas du système SA/Chol, les interactions électrostatiques SA-calcéine

devraient être plus fortes. De plus, la calcéine semble posséder les caractéristiques d'un anion chaotrope volumineux. Donc, en plus des interactions électrostatiques, la calcéine pourrait pénétrer dans la bicouche, de par sa nature hydrophobe, et ce phénomène pourrait contribuer à son impact plus intense sur l'agrégation.

### **5.3 : Conclusion**

Notre étude de calorimétrie à balayage a montré que certains anions peuvent avoir un effet sur la stabilité des vésicules cationiques de SA/Chol (50/50). L'ampleur de l'impact des anions est d'autant plus importante que son classement est haut en tant que kosmotrope dans la série d'Hofmeister. Plus la valence d'anions est grande, plus l'interaction électrostatique est importante. Pour deux anions avec la même valence ( $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$ ), plus l'anion est hydraté, plus la tension de surface à l'interface bicouche/phase aqueuse est grande, ce qui favorise l'agrégation des vésicules. Le régime étudié correspond aux conditions où la concentration des sels est suffisante pour neutraliser toutes les charges positives de la bicouche. Nos résultats montrent que la calcéine n'est pas une sonde fluorescente inerte avec le système SA/Chol. En fait, elle occuperait une place dans la liste des ions chaotropes volumineux.

Nous avons fait l'expérience avec seulement trois anions d'Hofmeister. Il serait important d'expérimenter avec d'autres anions dans la série d'Hofmeister pour compléter notre compréhension sur l'effet des sels sur le système SA/Chol (50/50). Par la suite, il serait intéressant d'examiner plus en détails l'effet de la calcéine sur d'autres liposomes cationiques et anioniques comme les vésicules PA/SChol et PA/SChol/Chol dans le but de déterminer jusqu'à quel point cet anion est une sonde inerte de perméabilité.

# Chapitre 6

## Conclusion générale

Lors de notre étude, nous avons essayé de former des bicouches lo orientées magnétiquement avec le mélange PA/stérol, et ce, afin d'étudier la diffusion latérale des lipides à l'aide de la RMN à gradients pulsés. Malheureusement, les diverses stratégies envisagées n'ont pas mené à la formation de bicelles orientées. Les deux premières approches consistaient en l'ajout d'un lipide à courtes chaînes (HA ou DHPC) dans le mélange PA-d<sub>31</sub>/Chol. Ces expériences, où la température et la concentration lipidique ont été variées, n'ont pas conduit à la formation de bicouches orientées magnétiquement. Dans la troisième approche, le système DMPC/DHPC, connu pour faire des bicouches orientées, a été modifié par l'ajout de Chol. Nous avons trouvé que cette addition inhibait l'orientation magnétique des bicouches. Par contre, il a été possible d'avoir des bicouches orientées avec l'axe  $n$  perpendiculaire au champ magnétique pour le mélange DMPC/DHPC/SS avec les proportions 67/19/14 et 72/21/7 à 40 °C et 50 °C. Il serait donc intéressant d'étudier le système PA/SS en présence d'un lipide à courtes chaînes afin d'observer si les bicouches formées s'orientent magnétiquement. Une autre piste serait d'étudier le système PA/Chol avec un lipide à courte chaîne en présence des lanthanides. Comme mentionné précédemment, la présence des lanthanides aide les bicouches incluant du Chol à s'orienter magnétiquement<sup>64</sup>. D'autres méthodes de caractérisation de la diffusion latérale des lipides pourraient être envisagées. Le retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP, de l'anglais *Fluorescence recovery after photobleaching*) est une technique utilisée à cette fin<sup>134</sup>. En FRAP, une impulsion de lumière de haute intensité photo-blanchit les fluorophores liés aux lipides dans une région définie. Le retour de la fluorescence est causé par la diffusion latérale des lipides qui n'ont pas été photo-blanchis vers la zone d'observation. La cinétique de ce retour permet la détermination du coefficient de la diffusion. La spectroscopie de corrélation de fluorescence et la microscopie en molécule unique sont également utilisées pour étudier la diffusion des lipides dans une membrane<sup>134</sup>. Les vésicules à base de PA sont prometteuses dans plusieurs domaines, d'où l'importance d'étudier leurs propriétés dynamiques et structurales.

Nos travaux ont aussi tenté d'identifier différentes formulations de liposomes, majoritairement composées de PA et d'un stérol, avec différentes perméabilités dans le but d'avoir un contrôle sur le temps de relargage de leur contenu. Premièrement, la substitution complète de PA par OA, possédant une insaturation dans la chaîne, a mené à des vésicules, ce qui n'a jamais été démontré auparavant. Par contre, la bicouche OA/Chol avait une perméabilité analogue à celle des bicouches PA/Chol. Deuxièmement, l'ajout de POPC dans le mélange PA/Chol n'a pas augmenté sa perméabilité. Il a été constaté des contradictions dans la littérature concernant la perméabilité des bicouches de PC pour la calcéine<sup>1, 86-87, 97-98</sup>. L'effet de la température sur le relargage de la calcéine était plus prononcé pour les bicouches POPC que pour les bicouches POPC/Chol (40/60), et devenait très limité pour les bicouches OA/Chol (30/70). Ces résultats suggèrent que l'expansion thermique est la plus grande pour le système POPC et que la présence du Chol limite cette expansion. Troisièmement, la substitution partielle de Chol par SC, une molécule chargée négativement n'ayant pas de chaîne alkyle en position 17, n'a pas permis d'accroître la perméabilité membranaire. Une première suggestion serait que le SC, présent dans la membrane, ne conduit pas à une diminution d'empilement des lipides. Une autre supposition serait que le SC, une molécule plus hydrophile, s'exclut de la membrane PA/Chol, pour former des micelles<sup>91</sup>, ce qui reste à confirmer par des études plus approfondies. Cependant, une très grande perméabilité a été observée en substituant totalement le Chol par SChol, une molécule chargée négativement, et en préparant la formulation à bas pH; le relargage est alors induit par la variation de pH. Un ajustement fin du pourcentage molaire de SChol entre 95 et 100<sup>59</sup> dans le mélange PA/Chol/SChol pourrait permettre d'obtenir une gamme de vitesse de libération du contenu. Une autre piste serait d'étudier le mélange PA/DHPC/Chol; l'ajout de lipides à courtes chaînes dans la membrane pourrait provoquer l'augmentation de la perméabilité en diminuant la densité d'empilement<sup>79</sup>.

Enfin, on a étudié l'influence des anions, incluant la calcéine, sur la stabilité des bicouches cationiques SA/Chol (50/50) à l'aide de DSC. Ce mélange hydraté à pH 7.4 ne présente pas de transition entre 25 et 90 °C. L'ajout de certains sels à des liposomes formés de ce mélange permet d'observer des agrégats et l'apparition d'une transition dans le thermogramme. L'effet des anions sur la température et l'enthalpie de transition suivent le même ordre que la série d'Hofmeister pour la précipitation des protéines d'œuf de poule<sup>106-108</sup> :  $SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > Cl^-$  (*pas de pic*). Les anions divalents provoquent la formation d'agrégats contrairement à



l'anion monovalent  $\text{Cl}^-$ , ce qui s'explique par des forces électrostatiques SA-anion plus fortes. L'anion  $\text{SO}_4^{2-}$  possède un plus grand degré d'hydratation que l'anion  $\text{HPO}_4^{2-}$ ; il augmente donc de manière plus considérable la tension interfaciale bicouche/phase aqueuse et favorise l'agrégation des liposomes. Cette tendance est observable dans les situations où la concentration des sels est assez haute pour neutraliser tous les sites avec les charges positives à la surface des vésicules, ce qui est le cas dans le cadre de nos travaux. L'influence de la calcéine était la plus prononcée sur la stabilité des vésicules SA/Chol. Son impact important sur l'agrégation est, en partie, expliqué par les fortes interactions électrostatiques entre la calcéine (charge -4) et le groupement ammonium de SA (charge +1), ce qui n'est pas le cas pour les interactions PC-calcéine (PC globalement neutre)<sup>132-133</sup>. De plus, on propose que la calcéine pourrait être un anion chaotrope volumineux. Ainsi, il pourrait faire des interactions hydrophobes avec les lipides; ceci pourrait contribuer à son impact plus intense sur l'agrégation. Les effets de la calcéine sur les liposomes SA/Chol indiquent que cette sonde fluorescente n'est pas un bon candidat pour étudier la perméabilité membranaire de ce système.

Pour la poursuite du travail, il serait intéressant d'étudier le système SA/Chol en présence des autres anions de la série d'Hofmeister pour généraliser nos résultats. Ensuite, il serait pertinent d'étudier l'influence de la calcéine sur la stabilité des autres vésicules cationiques et anioniques comme les vésicules PA/SChol et PA/SChol/Chol. Diverses études, autres que celles menées sur des propriétés thermodynamiques, peuvent être faites pour mieux établir et comprendre l'effet de la calcéine sur les bicouches<sup>132</sup>. L'emplacement de la calcéine dans la bicouche et son interaction avec la tête polaire des lipides peuvent être déterminés par la spectroscopie Raman et la spectroscopie de l'infrarouge réflexion-adsorption à modulation de phase. Il faut se rappeler que la calcéine est souvent utilisée comme sonde dans des expériences de perméabilité et que cette approche suppose l'absence d'interaction entre la calcéine et les liposomes. D'où l'importance de faire des études plus approfondies sur l'interaction de la calcéine avec les bicouches.

## Références

1. Bastiat, G.; Oliger, P.; Karlsson, G.; Edwards, K.; Lafleur, M., Development of non-phospholipid liposomes containing a high cholesterol concentration. *Langmuir* **2007**, *23*, 7695-7699.
2. Ouimet, J.; Lafleur, M., Hydrophobic match between cholesterol and saturated fatty acid is required for the formation of lamellar liquid ordered phases. *Langmuir* **2004**, *20*, 7474-7481.
3. Ouimet, J.; Croft, S.; Paré, C.; Katsaras, J.; Lafleur, M., Modulation of the polymorphism of the palmitic acid/cholesterol system by the pH. *Langmuir* **2003**, *19*, 1089-1097.
4. Cui, Z.-K.; Bastiat, G.; Jin, C.; Keyvanloo, A.; Lafleur, M., Influence of the nature of the sterol on the behavior of palmitic acid/sterol mixtures and their derived liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **2010**, *1798*, 1144-1152.
5. Cui, Z.-K.; Bouisse, A.; Cottenye, N.; Lafleur, M., Formation of pH-sensitive cationic non phospholipid liposomes with monoalkylated primary amine and cholesterol. *Langmuir* **2012**, *28*, 13668-13674.
6. Phoeung, T.; Huber, L. M.; Lafleur, M., Cationic detergent/sterol mixtures can form fluid lamellar phases and stable unilamellar vesicles. *Langmuir* **2009**, *25*, 5778-5784.
7. Cano-Sarabia, M.; Angelova, A.; Ventosa, N.; Lesieur, S.; Veciana, J., Cholesterol induced CTAB micelle-to-vesicle phase transitions. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, *350*, 10-15.
8. Cano-Sarabia, M.; Ventosa, N.; Sala, S.; Patino, C.; Arranz, R.; Veciana, J., Preparation of uniform rich cholesterol unilamellar nanovesicles using CO<sub>2</sub>-expanded solvents. *Langmuir* **2008**, *24*, 2433-2437.
9. Gater, D. L.; Seddon, J. M.; Law, R. V., Formation of the liquid-ordered phase in fully hydrated mixtures of cholesterol and lysopalmitoylphosphatidylcholine. *Soft Matter* **2008**, *4*, 263-267.

10. Cui, Z.-K. Novel non phospholipid liposomes with high sterol content: development and characterization. University de Montreal, Montreal, 2012.
11. Manosroi, A.; Wongtrakul, P.; Manosroi, J.; Sakai, H.; Sugawara, F.; Yuasa, M.; Abe, M., Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2003**, *30*, 129-138.
12. Cui, Z.-K.; Bastiat, G.; Lafleur, M., Formation of fluid lamellar phase and large unilamellar vesicles with octadecyl methyl sulfoxide/cholesterol mixtures. *Langmuir* **2010**, *26*, 12733-12739.
13. Israelachvili, J., *Intermolecular and surface forces 2nd edition*. Academic Press inc.: London, 1991.
14. Mouritsen, O. G., *Life - As Matter of Fat. The emerging Science of Lipidomics* Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, 2005.
15. Cullis, P. R.; Fenske, D. B.; Hope, M. J., Physical properties and functional roles of lipids in membranes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Vance, D. E.; Vance, J. E., Eds. Elsevier: Amsterdam, 1996; pp 1-33.
16. Van Deenen, L. L. M.; Op den Kamp, J. A. F.; Roelofsen, B.; Wirtz, K. W. A., On membrane phospholipids and protein-lipid association. *Pure and Applied Chemistry* **1982**, *54*, 2443-2454.
17. Mouritsen, O. G.; Zuckermann, M. J., What's so special about cholesterol? *Lipids* **2004**, *39*, 1101-1113.
18. Vance, D. E.; Van den Bosch, H., Cholesterol in the year 2000. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2000**, *1529*, 1-8.
19. Simons, K.; Ikonen, E., How cells handle cholesterol. *Science* **2000**, *290*, 1721-1726.
20. Mouritsen, O. G., The liquid-ordered state comes of age. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Biomembranes* **2010**, *1798*, 1286-1288.

21. Rog, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; Vattulainen, I.; Karttunen, M., Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **2009**, *1788*, 97-121.
22. Arseneault, M.; Lafleur, M., Cholesterol sulphate and Ca<sup>2+</sup> modulate the mixing properties of lipids in stratum corneum model mixtures. *Biophysical Journal* **2007**, *92*, 99-114.
23. Norlén, L.; Nicander, I.; Lundsjö, A.; Cronholm, T.; Forslind, B., A new HPLC-based method for the quantitative analysis in inner stratum corneum lipids with a special preference to the free fatty acid fraction. *Archives of Dermatological Research* **1998**, *290*, 508-516.
24. Fairhurst, C. E.; Fuller, S.; Gray, J.; Holmes, M. C.; Tiddy, G. G. T., High molecular weight liquid crystals. . In *Handbook of liquid crystals*, , Demus, D.; Goodby, J. W.; Gray, G. W.; Spiess, H. W.; Vill, V., Eds. Wiley-VCH: Weinheim, 1998; Vol. 3, pp 341-392.
25. Cistola, D. P.; Atkinson, D.; Hamilton, J. A.; Small, D. M., Phase behavior and bilayer properties of fatty acids : hydrated 1:1 acid-soaps. *Biochemistry* **1986**, *25*, 2804-2812.
26. Morigaki, K.; Walde, P., Fatty acid vesicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2007**, *12*, 75-80.
27. Marsh, D., *Handbook of lipid bilayers, 2nd edition*. CRC Press inc.: New York, 2013.
28. Danielsson, I.; Ekwall, P., Association equilibria in solutions of alkali salts of straight chain acids. I. salts of monocarboxylic acids. *Acta Chemica Scandinavica* **1955**, *9*, 1661-1670.
29. Shinoda, K., The critical micelle concentration of soap mixtures (two-component mixture). *The Journal of Physical Chemistry* **1954**, *58*, 541-544.
30. Almeida, P. F. F.; Vaz, W. L. C.; Thompson, T. E., Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers : a free volume analysis. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6739-6747.

31. Ipsen, J. H.; Karlström, G.; Mouritsen, O. G.; Wennerström, H.; Zuckermann, M. J., Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1987**, *905*, 162-172.
32. Bloom, M.; Evans, E.; Mouritsen, O. G., Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1991**, *24*, 293-397.
33. Bach, D.; Wachtel, E., Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2003**, *1610*, 187-197.
34. Huang, J.; Buboltz, J. T.; Feigenson, G. W., Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1999**, *1417*, 89-100.
35. Ibarguren, M.; Alonso, A.; Tenchov, B. G.; Goñi, F. M., Quantitation of cholesterol incorporation into extruded lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **2010**, *1798*, 1735-1738.
36. Lafleur, M.; Cullis, P. R.; Bloom, M., Modulation of the orientational order profile of the lipid acyl chain in the La phase. *European Biophysics Journal* **1990**, *19*, 55-62.
37. Paré, C.; Lafleur, M., Polymorphism of POPE/cholesterol system: a  $^2\text{H}$  nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopic investigation. *Biophysical Journal* **1998**, *74*, 899-909.
38. Urbina, J. A.; Pekarar, S.; Le, H. B.; Patterson, J.; Montez, B.; Oldfield, E., Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using  $^2\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - and  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1995**, *1238*, 163-176.
39. Paré, C.; Lafleur, M., Formation of liquid ordered lamellar phases in the palmitic acid/cholesterol system. *Langmuir* **2001**, *17*, 5587-5594.

40. Monck, M. A.; Bloom, M.; Lafleur, M.; Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N.; Cullis, P. R., Evidence for two pools of cholesterol in the *Acholeplasma laidlawii* strain B membrane: a deuterium NMR and DSC study. *Biochemistry* **1993**, *32*, 3081-3088.
41. Dufourc, E. J.; Parish, E. J.; Chitrakorn, S.; Smith, I. C. P., Structural and dynamical details of cholesterol-lipid interaction as revealed by deuterium NMR. *Biochemistry* **1984**, *23*, 6062-6071.
42. Marsan, M. P.; Muller, I.; Ramos, C.; Rodriguez, F.; Dufourc, E. J.; Czaplicki, J.; Milon, A., Cholesterol orientation and dynamics in dimyristoylphosphatidylcholine bilayers: a solid state deuterium NMR analysis. *Biophysical Journal* **1999**, *76*, 351-359.
43. Kelusky, E. C.; Dufourc, E. J.; Smith, I. C. P., Direct observation of molecular ordering of cholesterol in human erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1983**, *735*, 302-304.
44. Chen, Z.; Rand, R. P., The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and bending elasticity. *Biophysical Journal* **1997**, *73*, 267-276.
45. Lafleur, M.; Bloom, M.; Eikenberry, E. F.; Gruner, S. M.; Han, Y.; Cullis, P. R., Correlation between lipid plane curvature and lipid chain order. *Biophysical Journal* **1996**, *70*, 2747-2757.
46. Kodati, R. V.; Lafleur, M., Comparaison between orientational and conformational orders in fluid lipid bilayers. *Biophysical Journal* **1993**, *64*, 163-170.
47. Seelig, J., Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1977**, *10*, 353-418.
48. Vist, M. R.; Davis, J. H., Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures:  $^2\text{H}$  nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **1990**, *29*, 451-464.
49. Davis, J. H., Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biophysical Journal* **1979**, *27*, 339-358.

50. Dufoure, E. J.; Smith, I. C. P.; Jarrell, H. C., A  $^2\text{H}$ -NMR analysis of dihydrosterculoyl-containing lipids in model membranes : structural effects of a cyclopropane ring. *Chemistry and Physics of Lipids* **1983**, *33*, 153-177.
51. Paré, C. Formation de la phase liquide-ordonnée dans des matrices lipidiques. Université de Montréal, Montréal, 2000.
52. Sanders, C. R.; Prestegard, J. H., Magnetically orientable phospholipid bilayers containing small amounts of a bile salt analogue, CHAPSO. *Biophysical Journal* **1990**, *58*, 447-460.
53. Marcotte, I.; Auger, M., Bicelles as model membranes for solid- and solution-state NMR studies of membrane peptides and proteins. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **2005**, *24A*, 17-37.
54. Lafleur, M.; Fine, B.; Sternin, E.; Cullis, P. R.; Bloom, M., Smoothed orientational order profile of lipid bilayers by  $^2\text{H}$ -nuclear magnetic resonance. *Biophysical Journal* **1989**, *56*, 1037-1041.
55. Fenske, D. B.; Thewalt, J. L.; Bloom, M.; Kitson, N., Model of stratum corneum intercellular membranes:  $^2\text{H}$  NMR of macroscopically oriented multilayers. *Biophysical Journal* **1994**, *67*, 1562-1573.
56. Hadley, K. R.; McCabe, C., A simulation study of the self-assembly of coarse-grained skin lipids. *Soft Matter* **2012**, *8*, 4802-4814.
57. Soong, R.; Macdonald, P. M., PEG molecular weight and lateral diffusion of PEG-ylated lipids in magnetically aligned bicelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2007**, *1768*, 1805-1814.
58. Ouimet, J.; Croft, S.; Pare, C.; Katsaras, J.; Lafleur, M., Modulation of the polymorphism of the palmitic acid/cholesterol system by the pH. *Langmuir* **2003**, *19*, 1089-1097.
59. Bastiat, G.; Lafleur, M., Phase behavior of palmitic acid/cholesterol/cholesterol sulfate mixtures and properties of the derived liposomes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 10929-10937.

60. Christoforou, M.; Leontidis, E.; Brezesinski, G., Effects of Sodium Salts of Lyotropic Anions on Low-Temperature, Ordered Lipid Monolayers. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 14602-14612.
61. Pabst, G.; Hodzic, A.; Štrancar, J.; Danner, S.; Rappolt, M.; Laggner, P., Rigidification of neutral lipid bilayers in the presence of salts. *Biophysical Journal* **2007**, *93*, 2688-2696.
62. Allen, T. M., Calcein as a tool in liposome methodology. In *Liposome technology*, Gregoriadis, G., Ed. CRC Press: Boca Raton, 1984; pp 177-182.
63. Benachir, T.; Lafleur, M., Study of vesicle leakage induced by melittin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1995**, *1235*, 452-460.
64. Lu, J.-X.; Caporini, M. A.; Lorigan, G. A., The effects of cholesterol on magnetically aligned phospholipid bilayers: a solid-state NMR and EPR spectroscopy study. *Journal of Magnetic Resonance* **2004**, *168*, 18-30.
65. Katsaras, J.; Harroun, T.; Pencer, J.; Nieh, M.-P., "Bicellar" lipid mixtures as used in biochemical and biophysical studies. *Naturwissenschaften* **2005**, *92*, 355-366.
66. Sanders, C. R.; Schwonek, J. P., Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR. *Biochemistry* **1992**, *31*, 8898-8905.
67. Picard, F.; Paquet, M.-J.; Levesque, J.; Bélanger, A.; Auger, M., <sup>31</sup>P NMR first spectral moment study of the partial magnetic orientation of phospholipid membranes. *Biophysical Journal* **1999**, *77*, 888-902.
68. Nieh, M.-P.; Glinka, C. J.; Krueger, S.; Prosser, R. S.; Katsaras, J., SANS Study on the effect of lanthanide ions and charged lipids on the morphology of phospholipid mixtures. *Biophysical Journal* **2002**, *82*, 2487-2498.
69. Edholm, O.; Nagle, J. F., Areas of molecules in membranes consisting of mixtures. *Biophysical Journal* **2005**, *89*, 1827-1832.



70. Kanicky, J. R.; Shah, D. O., Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pKa of long-chain fatty acids. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *256*, 201-207.
71. Lewis, B. A.; Engelman, D. M., Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *Journal of Molecular Biology* **1983**, *166*, 211-217.
72. Crowell, K. J.; Macdonald, P. M., Surface charge response of the phosphatidylcholine head group in bilayered micelles from phosphorus and deuterium nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1999**, *1416*, 21-30.
73. Dave, P. C.; Nusair, N. A.; Inbaraj, J. J.; Lorigan, G. A., Electron paramagnetic resonance studies of magnetically aligned phospholipid bilayers utilizing a phospholipid spin label: the effect of cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2005**, *1714*, 141-151.
74. Ghimire, H.; Inbaraj, J. J.; Lorigan, G. A., A comparative study of the effect of cholesterol on bicelle model membranes using X-band and Q-band EPR spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids* **2009**, *160*, 98-104.
75. Smith, I. C. P.; Ekiel, I. H., Phosphorus-31 NMR of membranes. In *Phosphorus-31 NMR: Principles and Application*, Gorenstein, D. G., Ed. Academic Press, Inc.: London, 1984; pp 447-475.
76. Seelig, J., <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1978**, *515*, 105-140.
77. Ferrari, M., Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5*, 161-171.
78. Park, J. W., Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Research* **2002**, *4*, 1-5.

79. Maurer, N.; Fenske, D. B.; Cullis, P. R., Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opinion on Biological Therapy* **2001**, *1*, 923-947.
80. De Gier, J.; Mandersloot, J. G.; Van Deenen, L. L. M., Lipid composition and permeability of liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1968**, *150*, 666-675.
81. Drummond, D. C.; Zignani, M.; Leroux, J.-C., Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Progress in Lipid Research* **2000**, *39*, 409-460.
82. Rui, Y.; Wang, S.; Low, P. S.; Thompson, D. H., Dipalmitoylcholine–folate liposomes: an efficient vehicle for intracellular drug delivery. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 11213-11218.
83. Qualls, M. M.; Thompson, D. H., Chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate delivered via acid-labile dipalmitoylcholine-folate liposomes: intracellular localization and synergistic phototoxicity. *International Journal of Cancer* **2001**, *93*, 384-392.
84. Bondurant, B.; Mueller, A.; O'Brien, D. F., Photoinitiated destabilization of sterically stabilized liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2001**, *1511*, 113-122.
85. Drummond, D. C.; Zignani, M.; Leroux, J., Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Progress in Lipid Research* **2000**, *39*, 406-460.
86. Shimanouchi, T.; Ishii, H.; Yoshimoto, N.; Umakoshi, H.; Kuboi, R., Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, *73*, 156-160.
87. Maherani, B.; Arab-Tehrany, E.; Kheiriloom, A.; Geny, D.; Linder, M., Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie* **2013**, *95*, 2018-2033.

88. Philippot, J. R.; Milhaud, P. G.; Puyal, C. O.; Wallach, D. F. H., Non-phospholipid molecules and modified phospholipid components of liposomes. In *Liposomes as Tools in Basic Research and Industry*, Philippot, J. R.; Schuber, F., Eds. CRC Press: Boca Raton, 1995; pp 41-57.
89. Carbajal, G. Détermination de l'effet protecteur des liposomes non phospholipidiques à haute teneur en cholestérol. University of Montreal, Montreal, 2013.
90. Maza, A. D. L.; Perra, J. L., Assembly properties of the aggregates resulting in the solubilization of phosphatidylcholine bilayers by sodium cholate. *Journal of Surfactants and Detergents* **1998**, *1*, 41-47.
91. Simões, S. I.; Marquesa, C. M.; Cruza, M. E. M.; Cevcb, G.; Martinsa, M. B. F., The effect of cholate on solubilisation and permeability of simple and protein-loaded phosphatidylcholine/sodium cholate mixed aggregates designed to mediate transdermal delivery of macromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *58*, 509-519.
92. Kitson, N.; Monck, M.; Wong, K.; Thewalt, J.; Cullis, P. R., The influence of cholesterol 3-sulphate on phase behaviour and hydrocarbon order in model membrane systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1992**, *1111*, 127-133.
93. Smondyrev, A. M.; Berkowitz, M. L., Molecular dynamics simulation of dipalmitoylphosphatidylcholine membrane with cholesterol sulfate. *Biophysical Journal* **2000**, *78*, 1672-1680.
94. Faure, C.; Tranchant, J.-F.; Dufourc, E. J., Comparative effects of cholesterol and cholesterol sulfate on hydration and ordering of dimyristoylphosphatidylcholine membranes. *Biophysical Journal* **1996**, *70*, 1380-1390.
95. Wood, J. D.; Richardson, R. I.; Nute, G. R.; Fisher, A. V.; Campo, M. M.; Kasapidou, E.; Sheard, P. R.; Enser, M., Effects of fatty acids on meat Quality: a review. *Meat Science* **2004**, *66*, 21-32.

96. Beare-Rogers, J.; Dieffenbacher, A.; Holm, J. V., Lexicon of lipid nutrition (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry* **2001**, *73*, 685–744.
97. Piperoudi, S.; Ioannou, P. V.; Frederik, P.; Antimisiaris, S. G., Arsonoliposomes: effect of lipid composition on their stability and morphology. *Journal of Liposome Research* **2005**, *15*, 187–197.
98. Ono, A.; Takeuchi, K.; Sukenari, A.; Suzuki, T.; Adachi, I.; Ueno, M., Reconsideration of drug release from temperature-sensitive liposomes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2002**, *25*, 97-101.
99. Huster, D.; Jin, A., J.; Arnold, K.; Gawrish, K., Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by  $^{17}\text{O}$  NMR. *Biophysical Journal* **1997**, *73*, 855-864.
100. Needham, D.; McIntosh, T. J.; Evans, E., Thermomechanical and transition properties of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biochemistry* **1988**, *27*, 4668-4673.
101. Linseisen, F. M.; Thewalt, J. L.; Bloom, M.; Bayerl, T. M.,  $^2\text{H}$ -NMR and DSC study of SEPC-cholesterol mixtures. *Chemistry and Physics of Lipids* **1993**, *65*, 141-149.
102. Takahashi, H.; K., S.; I., H., Effects of cholesterol on the lamellar and the inverted hexagonal phases of dielaidoylphosphatidylethanolamine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1996**, *1289*, 209-216.
103. Kunz, W.; Lo Nostro, P.; Ninham, B. W., The present state of affairs with Hofmeister effects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2004**, *9*, 1-18.
104. Zhang, Y.; Cremer, P. S., Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10*, 658-663.
105. Lo Nostro, P.; Ninham, B. W., Hofmeister phenomena: an update on ion specificity in biology. *Chemical Reviews* **2012**, *112*, 2286-2322.

106. Kunz, W.; Henle, J.; Ninham, B. W., 'Zur lehre von der wirkung der salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2004**, *9*, 19-37.
107. Zhang, Y.; Cremer, P. S., Chemistry of Hofmeister anions and osmolytes. *Annual Review of Physical Chemistry* **2010**, *61*, 63-83.
108. Salis, A.; Ninham, B. W., Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 7358-7377.
109. Collins, K. D.; Washabaugh, M. W., The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1985**, *18*, 323-422.
110. Kropman, M. F.; Bakker, H. J., Effect of Ions on the vibrational relaxation of liquid water. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 9135-9141.
111. Kropman, M. F.; Bakker, H. J., Vibrational relaxation of liquid water in ionic solvation shells. *Chemical Physics Letters* **2003**, *370*, 741-746.
112. Omta, A. W.; Kropman, M. F.; Woutersen, S.; Bakker, H. J., Influence of ions on the hydrogen-bond structure in liquid water. *The Journal of Chemical Physics* **2003**, *119*, 12457-12461.
113. Omta, A. W.; Kropman, M. F.; Woutersen, S.; Bakker, H. J., Negligible effect of ions on the hydrogen-bond structure in liquid water. *Science* **2003**, *301*, 347-349.
114. Batchelor, J. D.; Olteanu, A.; Tripathy, A.; Pielak, G. J., Impact of protein denaturants and stabilizers on water structure. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 1958-1961.
115. Vlachy, N.; Drechsler, M.; Verbavatz, J. M.; Touraud, D.; Kunz, W., Role of the surfactant headgroup on the counterion specificity in the micelle-to-vesicle transition through salt addition. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *319*, 542-548.

116. Schild, H. G.; Tirrell, D. A., Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer solutions. *The Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 4352-4356.
117. Freitag, R.; Garret-Flaudy, F., Salt effects on the thermoprecipitation of poly-(n-isopropylacrylamide) oligomers from aqueous solution. *Langmuir* **2002**, *18*, 3434-3440.
118. Sanderson, P. W.; Lis, L. J.; Quinn, P. J.; Williams, W. P., The Hofmeister effect in relation to membrane lipid phase stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1991**, *1067*, 43-50.
119. Song, J.; Franck, J.; Pincus, P.; Kim, M. W.; Han, S., Specific ions modulate diffusion dynamics of hydration water on lipid membrane surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 2642-2649.
120. Oncsik, T.; Trefalt, G.; Borkovec, M.; Szilagy, I., Specific ion effects on particle aggregation induced by monovalent salts within the Hofmeister series. *Langmuir* **2015**, *31*, 3799-3807.
121. Söderlund, T.; Alakoskela, J.-M. I.; Pakkanen, A. L.; Kinnunen, P. K. J., Comparison of the effects of surface tension and osmotic pressure on the interfacial hydration of a fluid phospholipid bilayer. *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 2333-2341.
122. Evans, D. F.; Wennerström, H., *The colloidal domain: where physics, chemistry, biology, and technology meet*. Wiley-VCH: New-York, 1999.
123. Elimelech, M.; Jia, X.; Gregory, J.; Williams, R., *Particle deposition & aggregation: measurement, modelling and simulation*. Elsevier Science Technology: Toronto, 1998.
124. Oncsik, T.; Trefalt, G.; Csendes, Z.; Szilagy, I.; Borkovec, M., Aggregation of negatively charged colloidal particles in the presence of multivalent cations. *Langmuir* **2014**, *30*, 733-741.

125. Tezak, B.; Matijevic, E.; Schuiz, K. F., Coagulation of hydrophobic sols in statu nascendi. III. The influence of the ionic size and valency of the counterion. *The Journal of Physical Chemistry* **1955**, *59*, 769-773.
126. Trefalt, G.; Szilagyi, I.; Borkovec, M., Poisson–Boltzmann description of interaction forces and aggregation rates involving charged colloidal particles in asymmetric electrolytes. *Journal of Colloid and Interface Science* **2013**, *406*, 111-120.
127. McCarley, R. L.; Forsythe, J. C.; Loew, M.; Mendoza, M. F.; Hollabaugh, N. M.; Winter, J. E., Release rates of liposomal contents are controlled by kosmotropes and chaotropes. *Langmuir* **2013**, *29*, 13991-13995.
128. Leontidis, E.; Christoforou, M.; Georgiou, C.; Delclos, T., The ion–lipid battle for hydration water and interfacial sites at soft-matter interfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2014**, *19*, 2-8.
129. Sachs, J. N.; Woolf, T. B., Understanding the Hofmeister effect in interactions between chaotropic anions and lipid bilayers: molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 8742-8743.
130. Shapovalov, V.; Tronin, A., Interaction of hydrophobic ions with a Langmuir monolayer of dioctadecyldimethylammonium bromide. *Langmuir* **1997**, *13*, 4870-4876.
131. Shapovalov, V. L., Interaction of DPPC monolayer at air–water interface with hydrophobic ions. *Thin Solid Films* **1998**, *327–329*, 599-602.
132. Maherani, B.; Arab-Tehrany, E.; Rogalska, E.; Korchowiec, B.; Kheirilomoom, A.; Linder, M., Vibrational, calorimetric, and molecular conformational study on calcein interaction with model lipid membrane. *Journal of Nanoparticle Research* **2013**, *15*, 1-17.
133. Ahumada, M.; Calderon, C.; Alvarez, C.; Lanio, M. E.; Lissi, E. A., Response of unilamellar DPPC and DPPC:SM vesicles to hypo and hyper osmotic shocks: a comparison. *Chemistry and Physics of Lipids* **2015**, *188*, 54-60.

134. Chen, Y.; Lagerholm, B. C.; Yang, B.; Jacobson, K., Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods* **2006**, *39*, 147-153.